

Université de Sherbrooke

**Le rôle du récepteur opioïde delta dans les afférences primaires**

Par  
Sylvie Blouin  
Programme de physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)  
en physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada  
Septembre 2019

Membres du jury d'évaluation  
Louis Gendron, Département de pharmacologie-physiologie  
Dimitri Ryczko, Département de pharmacologie-physiologie  
Nathalie Perreault, Département d'anatomie et de biologie cellulaire

## RÉSUMÉ

### Le rôle du récepteur opioïde delta dans les afférences primaires

Par

Sylvie Blouin

Programmes de physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en physiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La douleur chronique est souvent traitée au moyen de composés opioïdiques ciblant le récepteur opioïde mu (MOP), et qui dans la grande majorité des cas est aussi associé au développement d'effets secondaires débilissants. En revanche, lorsqu'étudié chez la souris, le récepteur opioïde delta (DOP) provoque des effets analgésiques en plus d'effets anxiolytiques et antidépresseurs, ce qui en fait une cible potentielle réellement intéressante. Cependant, ces effets observés pourraient être différents de ceux observables chez l'humain puisque le patron d'expression du DOP chez la souris n'est pas le même chez l'être humain. Pour pouvoir extrapoler chez l'humain les effets potentiels de nouveaux analgésiques ciblant le DOP, il est essentiel de développer un meilleur modèle d'étude. Le profil d'expression chez l'humain semble se limiter principalement aux afférences primaires et, en moindre concentration, dans quelques régions du cerveau. Donc, nous avons décidé de développer une souris transgénique qui nous permettrait d'exprimer le DOP préférentiellement dans les afférences primaires, en excluant l'expression du récepteur dans les neurones de la moelle épinière. Pour parvenir à ce résultat, nous avons croisé une souris *AdvillinCre*<sup>ERT2</sup> avec une souris STOP-FlagDOP. Advillin est un promoteur permettant l'expression de la protéine recombinante Cre dans les neurones sensoriels périphériques. ERT2 (récepteur œstrogène humain modifié) permet l'accès de la Cre au noyau à la suite de son activation par le Tamoxifène. La présence de la Cre recombinase permettra de retirer la cassette d'arrêt d'expression encadré par deux sites loxP. Cette action permettra la réexpression du récepteur dans les afférences primaires, mais pas dans les neurones de la moelle épinière ni les neurones efférents moteurs.

Mots clés : Von Frey, Hargreaves, *AdvillinCre*<sup>ERT2</sup>, souris transgénique, FLAG, afférences primaires, récepteur opioïde delta, douleur chronique

## TABLE DES MATIÈRES

<b>Résumé.....</b>	<b>ii</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>iii</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>vi</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>vii</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
Douleur.....	1
Récepteurs aux opioïdes.....	7
Récepteur opioïde delta.....	9
Souris de transgénèse .....	13
Souris STOP-FlagDOP .....	14
Épitope FLAG.....	15
Hypothèse et problématique.....	16
Objectifs .....	17
<b>Méthodes.....</b>	<b>20</b>
Souris de transgénèse .....	20
Souris FlagDOP-KI(c).....	20
Souris <i>AvCre</i> <sup>ERT2</sup> :STOP-FlagDOP .....	21
Souris <i>ROSA</i> <sup>nT/nG</sup> .....	22
Collecte de tissus et fixation .....	24
Clarification des tissus .....	24
Génotypage .....	27
Extraction de l'ADN .....	27
RT-qPCR.....	28
Migration sur gel d'agarose.....	29

Section de tissus .....	29
Microtome .....	29
Cryostat .....	30
Vibratome .....	30
Immunohistochimie.....	30
Immunofluorescence sur cellules .....	33
Microscopie.....	33
Épifluorescence .....	33
Confocale.....	33
Autoradiographie sur sections.....	34
Tests comportementaux .....	34
Hargreaves.....	35
Von Frey.....	35
Souris injectées avec virus adénoassocié .....	36
<b>Résultats.....</b>	<b>38</b>
Souris de transgénèse .....	38
Détermination du génotype Cre par RT-qPCR .....	38
Immunohistochimie.....	39
Détection du FLAG .....	39
Immunofluorescence sur cellules .....	43
Détection du FLAG .....	43
Autoradiographie sur sections.....	44
Détection du récepteur DOP avec ligand radiomarqué .....	44
Fluorescence sur tissus .....	46
Souris <i>ROSA<sup>nT/nG</sup></i> .....	46

Tests comportementaux .....	48
Hargreaves .....	48
Souris injectées avec virus adénoassocié .....	50
<b>Discussion .....</b>	<b>53</b>
<b>Liste des références .....</b>	<b>63</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique des voies principales de la douleur.....	3
Figure 2 : Représentation schématique de la génération des souris STOP-FlagDOP et FlagDOP-KI(c) .....	15
Figure 3 : Représentation schématique de la génération des souris $\Delta\nu\text{Cre}^{\text{ERT2}}\text{:STOP-FlagDOP}$ .....	22
Figure 4 : Représentation schématique du croisement de la souris $\Delta\nu\text{Cre}^{\text{ERT2}}$ avec la souris $\text{ROSA}^{\text{nT/mG}}$ .....	23
Figure 5 : Graphique représentant les copies du transgène codant pour la Cre obtenue par RT-qPCR .....	38
Figure 6 : Tentative de détection du FLAG par l'utilisation d'un anti-FLAG de lapin polyclonal .....	40
Figure 7 : Image confocale d'un essai de révélation du FLAG par clarification de tissus ...	42
Figure 8 : Essai de détection du FLAG après digestion à la sulfatase VIII .....	42
Figure 9 : Autoradiographie sur sections avec ligand $^{125}\text{[I]}$ -deltorphine I.....	45
Figure 10 : Présence de recombinaison par la Cre recombinase dans les noyaux des cellules de DRG permettant l'expression de la eGFP (en vert) au lieu de la tdTomato (en rouge) .....	47
Figure 11 : Graphique comparatif des seuils moyens de douleur d'origine thermique en situation inflammatoire chez nos différentes souris de transgénèse obtenues au moyen du test de Hargreaves .....	48
Figure 12 : Photographie représentant le niveau d'expression de la eGFP sur des tranches de DRG provenant de différents niveaux lombaires en comparaison avec deux voies d'injection du virus $r\text{AAV2/9-CBA-Cre}^{\text{GFP}}$ .....	51
Figure 13 : Représentation graphique des taux d'infection moyens obtenus par les différentes voies d'injection.....	52

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC	Complexe Avidine-Biotine, <i>Avidin-Biotin complex</i>
AMPc	Adénosine Monosulfate cyclique, <i>Cyclic Adenosin Monosulfate</i>
$\beta$ arr	$\beta$ arrestine, <i><math>\beta</math> arrestin</i>
BSA	Albumine de sérum bovin, <i>Bovine Serum Albumin</i>
CBA	Promoteur de la $\beta$ -actine de poulet, <i>Chicken <math>\beta</math>-actin promotor</i>
CCPA	Conseil Canadien de la protection des animaux, <i>Canadian council on animal care</i>
Cdk5	Kinase 5 dépendante des cyclines, <i>Cyclin-dependant kinase 5</i>
CFA	Adjuvant complet de Freund, <i>Complete Freund's Adjuvant</i>
CIDN	Contrôle inhibiteur diffus nociceptif, <i>diffuse nociceptive inhibitory control</i>
CPM	Modulation de douleur conditionnée, <i>conditioned pain modulator</i>
Ct	Cycle Seuil, <i>Cycle Threshold</i>
DAB	Diamino benzidine, <i>Diamino benzidine</i>
DLT	Deltorphine, <i>Deltorphan</i>
DOP	Peptide opioïde delta, <i>Delta opioid peptide</i>
DRG	Ganglions rachidiens dorsaux, <i>Dorsal Root Ganglion</i>
ERT2	Récepteur à l'œstrogène humain modifié, <i>modified human oestrogen receptor</i>
GRKs	Kinases régulées par protéine G, <i>G protein-regulated kinases</i>
HRP	Peroxydase de raifort, <i>Horseradish peroxidase</i>
IASP	Association internationale pour l'étude sur la douleur, <i>International Association for the Study of Pain</i>
Ig	Immunoglobuline, <i>Immunoglobulin</i>

KI(c)	Knock-in conditionnel, <i>conditional knock-in</i>
NK1	Neurokinine-1, <i>Neurokinin-1</i>
NGF	Facteur de croissance des nerfs, <i>nerve growth factor</i>
KO	Knockout, <i>Knockout</i>
KO(c)	Knockout conditionnel, <i>conditional knockout</i>
KOP	Peptide opioïde kappa, <i>Kappa opioid peptide</i>
MOP	Peptide opioïde mu, <i>Mu opioid peptide</i>
NGS	Sérum normal de chèvre, <i>Normal Goat Serum</i>
PBS	Tampon phosphate salin, <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PFA	Paraformaldéhyde, <i>Paraformaldehyde</i>
PWT	Seuil de retrait de la patte, <i>Paw withdrawal threshold</i> RCPG
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G, <i>G protein coupled receptors</i>
rAAV	Virus adénoassocié recombinant, <i>Recombinant adeno-associated virus</i>
RT-qPCR	Réactions de polymérase en chaîne quantitative en temps réel, <i>Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
TBS	Tampon Tris salin, <i>Tris Buffer Saline</i>



## INTRODUCTION

### DOULEUR

La douleur est une expérience que tous ont éprouvée, sauf exception, au moins une fois dans leur vie pour des raisons bien diverses. La douleur a pour but essentiel de nous protéger des événements potentiellement dangereux et ainsi conserver l'intégrité de l'organisme. Elle incite un réflexe de retrait dans la plupart des cas, ce qui prévient l'exposition prolongée à des stimuli nocifs qui peuvent être d'origine chimique, thermique ou mécanique. La nociception ou bien la détection de stimuli douloureux se fait par l'activation de fibres nociceptives A $\delta$  et C. Les fibres A $\delta$  sont des fibres neuronales myélinisées à conduction rapide tandis que les fibres C sont non-myélinisées et leur conduction est lente (Basbaum & Jessell, 2000). Elles transmettent des influx qui, respectivement, peuvent être perçus comme de la douleur localisée et rapide ou lente et diffuse. Cependant, les fibres C ne sont pas toutes nociceptives, quelques-unes d'entre elles peuvent répondre aussi à des stimuli tels que le refroidissement. Certaines semblent même médier l'aspect plaisant du toucher (Olausson et al., 2008). Parmi les afférences primaires se trouvent aussi des fibres proprioceptives (A $\beta$ ) qui sont de large diamètre et fortement myélinisées, la transmission de leur influx étant quasi immédiate. Ces fibres sont responsables de la propagation de signaux indolores. Ces fibres afférentes sensorielles ont des origines viscérales, cutanées et musculaires, mais toutes se rejoignent dans la corne dorsale de la moelle épinière. En plus, elles diffèrent des autres fibres nerveuses en ayant un potentiel de réponse à ses deux extrémités, périphérique et centrale, puisqu'elles sont des fibres dites pseudo-unipolaires. À la suite de la stimulation des nocicepteurs, le message est transmis aux neurones secondaires par la relâche de neurotransmetteurs excitateurs (ex. glutamate). Toutefois, seule la terminaison périphérique des fibres afférentes est capable de percevoir les stimuli environnementaux. La sensibilité des fibres afférentes peut être influencée par le contrôle de différentes variables aux terminaisons centrales et périphériques. La sensibilisation centrale peut être causée par une augmentation de la concentration cytosolique de Ca<sup>2+</sup> via les récepteurs NMDA, par un changement de la balance K<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> en réduisant l'activité des co-transporteurs KCC2 produisant une

désinhibition ou bien par l'accumulation de cytokines (ex.  $\text{TNF-}\alpha$ , interleukin- $1\beta$  et interleukin-6) dans le fluide cérébrospinal. En revanche, la sensibilisation périphérique dans la plupart des cas est causé par une augmentation d'agents inflammatoires autour des fibres neuronales tels que des neurotransmetteurs (principalement glutamate), des peptides (substance P, CGRP et bradykinine), des lipides (prostaglandines, thromboxanes, leucotriènes et endocannabinoïdes) et des protéines (neutrophines, cytokines et chimiokines) modifiant le seuil d'activation des nocicepteurs (Basbaum et al., 2009). La projection des fibres afférentes dans les couches de la corne dorsale suit une organisation anatomique bien établie. Les fibres  $\text{A}\delta$  se retrouvent au niveau de la couche I et V alors que les fibres C projettent dans les couches I et II. Les fibres non nociceptives  $\text{A}\beta$  projettent plutôt vers les couches III, IV et V (Basbaum & Jessell, 2000). Cette organisation révèle l'importance des couches I et II dans la voie ascendante nociceptive.

Les afférences primaires sont le premier groupe de neurones (neurones de premier ordre) impliqués dans la transduction du signal proprioceptif (perception du corps dans l'espace) ou nociceptif. Il y a ensuite, les neurones secondaires ou les neurones de deuxième ordre partant de la moelle épinière qui communiquent jusqu'au cerveau au moyen du neurotransmetteurs excitateurs, glutamate. Parfois entre ces deux groupes de neurones, il y a des interneurones inhibiteurs, situé dans la corne dorsale de la moelle épinière, qui sont de très courts neurones responsables de réduire ou d'éliminer la transmission du signal nociceptif ascendant. Rendu au niveau cérébral, plus précisément dans le thalamus, l'influx peut traverser un autre groupe de neurones soit les neurones de troisième ordre qui transmettent l'information jusqu'au cortex cérébral. De plus, les afférences peuvent être divisés en deux voies principales nociceptives : les voies spinothalamiques médiale et latérale. Les voies spinothalamiques médiale et latérale se rendent au thalamus, qui est considéré comme le centre de relais pour les informations sensorielles. Entre autres, la voie spinothalamique latérale est composée de neurones de troisième ordre menant au cortex cérébral permettant l'identification et la localisation de la source de la douleur. La voie spinothalamique médiale, quant à elle, se rend à diverses régions cérébrales telles que

l'amygdale, l'hypothalamus, la substance grise périaqueducale et les noyaux basaux afin de distinguer l'intensité du stimulus et de produire une réponse émotionnelle (Fig. 1).

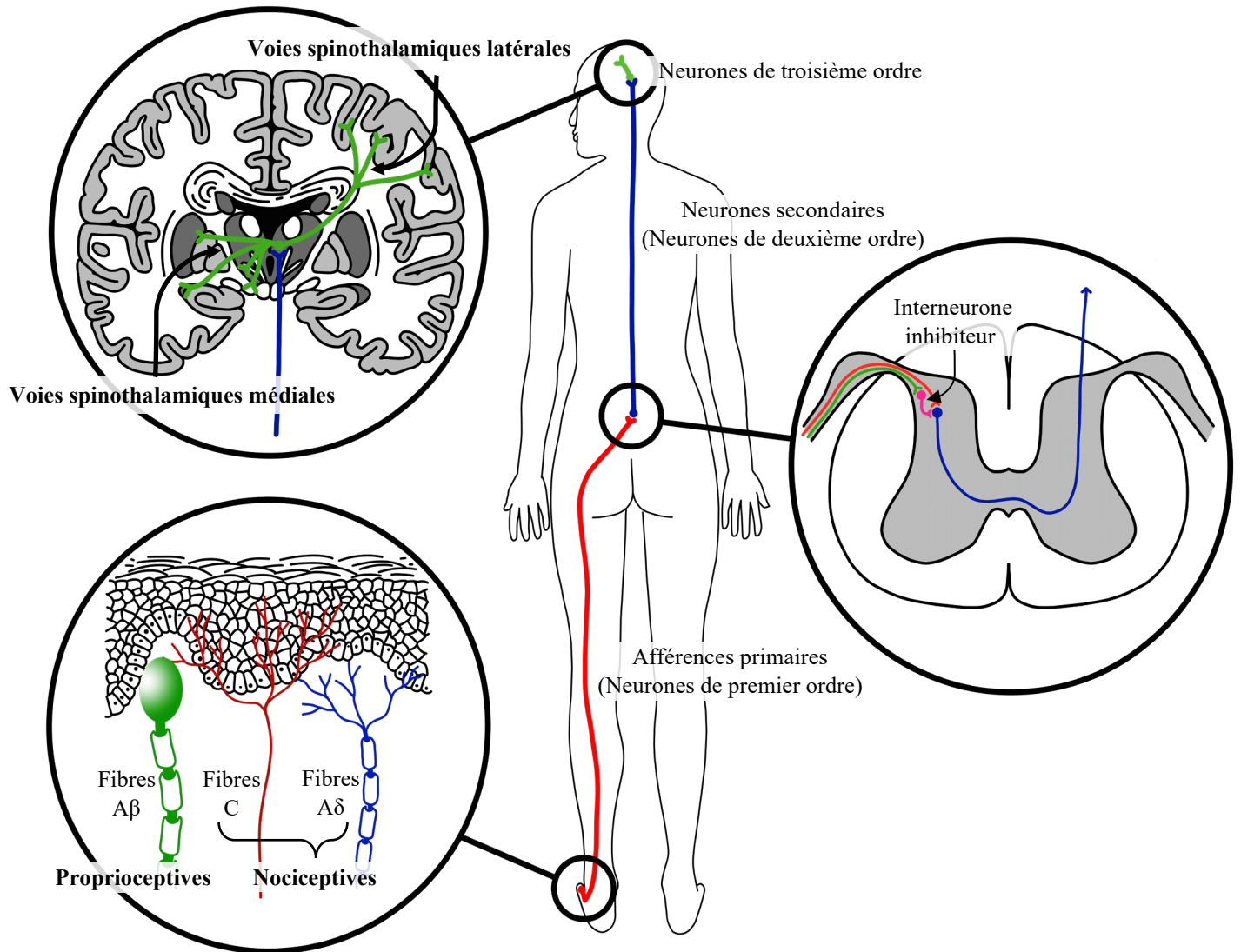


Figure 1 : Représentation schématique des voies principales de la douleur.

La perception de la douleur, comme mentionnée, se produit donc au cerveau. Sans l'aspect de la perception, la nociception ne peut être considérée comme de la douleur. La douleur possède donc deux composantes, soit une composante sensorielle intense et inconfortable ainsi qu'une composante émotionnelle de détresse. Les émotions que peuvent entraîner la douleur incluent, sans s'y limiter, le stress, l'anxiété et la dépression. En conséquence, la nociception seule n'est pas une condition suffisante pour établir qu'il y a une douleur, comme c'est le cas lorsque nous sommes distraits tel en situation d'activités

physiques intenses. Il peut arriver de nous blesser et de ne le réaliser qu'après l'activité, lorsque nous sommes en repos. La réciproque en est tout aussi vrai, la douleur est possible sans nociception ce qui est le cas dans les douleurs neuropathiques qui sont aussi présentes en l'absence visible de lésions tissulaires.

Une douleur peut être divisée en deux classes soit une douleur aiguë ou une douleur chronique. La douleur aiguë est de courte durée. Elle sert à transmettre un message d'alerte à l'organisme afin que celui-ci puisse prendre des mesures pour éviter le stimulus nociceptif. À la suite d'une lésion tissulaire, l'organe peut se sensibiliser grâce à la formation d'une « soupe inflammatoire » composée de peptides (ex. bradykinine), de neurotransmetteurs (ex. sérotonine), de lipides (ex. prostaglandines) et de neurotrophines (ex. facteur de croissance des nerfs (NGF)) en réduisant le seuil d'activation et en excitant les fibres A $\beta$  et les fibres C. La sensibilisation périphérique s'accroît davantage lorsque les nocicepteurs des fibres afférentes primaires relâchent de la substance P (Nocicepteur peptidergique). La substance P provoque une vasodilatation des vaisseaux sanguins ce qui libère des protéines et d'autres agents, telle que les histamines, dans l'espace extracellulaire près des terminaisons nerveuses induisant ainsi une inflammation neurogénique. Ces changements extracellulaires attirent des cellules immunitaires afin de potentiellement réparer les dommages à l'organe touché, mais peuvent aussi provoquer une persistance de la « soupe inflammatoire » et créer encore plus de sensibilité. Ceci peut entraîner alors une hyperalgésie ou bien encore une allodynie. L'hyperalgésie correspond à une perception plus intense d'un signal nociceptif tandis que l'allodynie décrit un signal qui à l'origine n'était pas douloureux mais qui est perçu comme tel. En général, l'hyperalgésie et l'allodynie s'installent afin de prévenir que l'endroit affecté ne soit davantage en contact avec des stimuli pouvant l'endommager. Habituellement lorsque le site lésé guérit, la douleur disparaît. La douleur chronique peut quant à elle s'installer, lorsqu'en absence de stimuli nociceptifs mesurables, les fibres nociceptives continuent de s'activer produisant ainsi une sensation de douleur. Cette douleur est très souvent d'origine inflammatoire chronique ou neuropathique et peut être maintenue sur des mois, voire même des années.

D'ailleurs, selon le National Institute of Health (2013), la prévalence de la douleur chronique en Amérique du Nord est d'un individu sur trois; ce qui représente une prévalence

supérieure à celle combinée du diabète, du cancer et des maladies cardiovasculaires. Les conséquences sociétales de la douleur chronique en perte économique sont aussi des plus importantes. Au Canada, on rapporte qu'à chaque année environ six milliards de dollars y sont attribués en coûts directs de soins de santé et plus de 37 milliards de dollars en coûts indirects (ex. perte de productivité) (Lynch, 2011) . Pour pallier cette douleur, les médecins Canadiens, en 2015, ont en moyenne prescrit 853 mg/habitant en équivalence de morphine selon le "*PPSG, Pain and Policy Studies Group, 2015*". Cependant, 30 % des individus à qui l'on a prescrit des opioïdes ne perçoivent pas ou peu d'analgésie (Bandolier, 2007) et sur le pourcentage restant, 80 % des patients traités aux opioïdes perçoivent aussi des effets secondaires indésirables tel que des troubles respiratoires, de la constipation, des nausées, de la tolérance et de la dépendance (Kalso et al., 2004). La morphine et ses dérivés ciblent des récepteurs aux opioïdes qui ont pour but d'inhiber la transmission nociceptive au cerveau et par conséquent produisent une analgésie.

Les opioïdes, qui comprennent la morphine et ses dérivées, sont reconnues comme étant des analgésiques puissants. L'analgésie est produite suite à la liaison de ces composées à des récepteurs aux opioïdes qui produisent une inhibition de la douleur via ses voies afférences. Outre ces récepteurs, il existe plusieurs mécanismes de modulation de la douleur. Toutefois, il existe une variation importante entre ces mécanismes quant à leur efficacité ou leur étendue d'action. À plus petite échelle, il y a la théorie du portillon, un système inhibiteur local de la douleur. Lorsque la douleur est ressentie, nous sommes portés à vouloir exercer de la pression sur l'endroit affecté. Cette pression active les fibres proprioceptives A $\beta$ , qui envoient un signal excitateur aux mêmes interneurons inhibiteurs que ceux activés par les fibres nociceptives. L'activation des interneurons produit un signal inhibiteur à la moelle épinière, sur les neurones afférentes de deuxième ordre, qui a pour effet de produire une inhibition locale, du moins partielle, de la douleur (Melzack & Wall, 1965). L'inhibition des interneurons bloque soit totalement, ou bien en parti la transmission du signal nociceptive au neurones de deuxième ordre. À plus grande échelle, il existe un autre mécanisme de régulation nommé contrôle inhibiteur diffus nociceptif (CIDN) chez les rongeurs et l'équivalent humain serait la modulation de la douleur conditionnée (CPM) (Shrout & Fleiss, 1979). Contrairement à la théorie du portillon, selon laquelle l'inhibition se produit directement sur la voie ascendante de la douleur, l'origine inhibitrice de la CPM proviendrait

de la voie descendante pour ensuite produire une inhibition subséquente de la douleur par la voie ascendante. En effet, le CPM engagerait des régions cérébrales telles que la substance grise périaqueducale, la région rostrale du bulbe ventromédial et le subnucleus reticularis dorsalis. Des signaux en provenance de ces régions sont envoyés à la moelle épinière et produiraient une inhibition diffuse de la nociception (Millan, 2002), à la suite d'une perception initiale au niveau cérébral. Dans le cas présent, la douleur permettrait en d'autres mots d'inhiber la douleur à son tour. La stimulation des régions mentionnées ci-dessus provoque une inhibition de la nociception par la relâche de noradrénaline et d'opioïdes endogènes, tel que la  $\beta$ -endorphine, les enképhalines et les dynorphines, par de nombreuses afférences primaires, dans la moelle épinière et particulièrement dans la corne dorsale. (Damien et al., 2018; Wen et al., 2010). Ces composés proviennent de précurseurs distincts qui sont respectivement la pro-enképhaline, la pro-opiomélanocortine et la pro-dynorphine, respectivement. La formation des peptides opioïdiques endogènes est régulée par l'activité d'endopeptidases et de carboxypeptidases (Abdallah & Gendron, 2018).

Ceci met donc en lumière l'importance du système opioïdique dans le contrôle de la douleur. Ce système comprend trois principaux groupes de récepteurs ( $\mu$ ,  $\delta$  et  $\kappa$ ) tous ayant un potentiel analgésique qui est produit par leur liaison avec des opioïdes endogènes ou bien, lorsque leurs présences uniques sont insuffisantes, par des agonistes pharmaceutiques. Les deux mécanismes modulateurs présentés précédemment, exploitent entre autres la fonction analgésique des récepteurs opioïdiques, mais ils ne sont pas très efficaces en situation de douleur chronique. Dans les deux cas, une stimulation continue proprioceptive ou bien nociceptive pour la théorie du portillon et de la CPM, respectivement, n'est pas bien réaliste en situation de douleur chronique. Cependant, même si la stimulation continue à long terme serait réalisable, les systèmes noradrénergiques et opioïdiques se fatiguent. En situation de douleur chronique le signal nociceptif est souvent plus intense ou bien plus fréquent. Ce changement rend l'inhibition du signal plus compliqué car les interneurons inhibiteurs sont surexploités, la plupart des récepteurs opioïdiques présents dans la moelle épinière s'internalisent et les réserves de noradrénaline se déplètent. Ceci nous force alors à considérer des cibles pharmacologiques potentielles dans le traitement de la douleur chronique. Considérant l'utilisation globale de la morphine et ses dérivés comme analgésiques, et ce depuis des décennies, nous pouvons convenir que les récepteurs

opioïdiques sont des cibles pharmacologiques intéressantes avec un fort potentiel thérapeutique.

## **RÉCEPTEURS AUX OPIOÏDES**

Les récepteurs aux opioïdes font partie de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ils possèdent sept domaines transmembranaires et ils s'activent lorsqu'une molécule opioïdique (opioïdes endogènes) se lie à leur pochette d'activation localisée au centre du récepteur (Cox, 2012). La liaison avec divers agonistes, soit endogènes (libérés par des neurones opioïdiques présentes dans l'ensemble du système nerveux central) ou exogènes (tel que la morphine et ses dérivées), peut stabiliser différentes conformations du récepteur, ce qui produit des effets très variables pour un même récepteur (Deupi & Kobilka, 2010; T. Kenakin, 2011; Terry Kenakin, 2003). Son activation est suivie du recrutement de protéines G qui par la suite enclenchent une cascade signalétique, ce qui amplifie le signal initial. La cascade, produite par l'activation des récepteurs aux opioïdes, sert à recruter divers effecteurs, tel que l'ouverture de canaux ioniques potassiques (North et al., 1987) ou l'inhibition des canaux calciques voltage-dépendants, l'inhibition de la production de l'AMPc (P. Y. Law & Loh, 1993), la stimulation de kinases ERK et src (Gutstein et al., 1997) et l'induction de  $\beta$  arrestine ( $\beta$ arr) (Cheng et al., 1998) qui ont tous pour but de diminuer l'activité neuronale ou de modifier l'expression des gènes. (Al-Hasani and Bruchas, 2011; Gendron et al., 2016; Kieffer and Evans, 2009). Ceci peut contribuer à réguler plusieurs procédés physiologiques tels que le stress, les émotions, la douleur et la récompense (Al-Hasani & Bruchas, 2011; Sauriyal et al., 2011). Il est à noter que les récepteurs opioïdiques ne sont pas uniquement présents dans les tissus nerveux, mais aussi dans les tissus musculaires viscéraux. Dans cette sous-famille de récepteurs aux opioïdes se trouvent trois types principaux : mu (MOP), delta (DOP) et kappa (KOP) (Feng et al., 2012 ; Pradhan et al., 2012 ; Rachinger-Adam et al., 2011 ; Traynor, 2013). Le MOP étant le meneur comme cible analgésique ciblant la douleur aiguë, cependant le DOP serait une cible analgésique beaucoup plus efficace en situation de douleur chronique.

Malgré son statut catégorique d'analgésique, la morphine par l'activation du MOP est aussi reconnue pour être responsable des effets secondaires indésirables produits. En effet, ce composé et les autres produits morphiniques (non-endogènes) ne sont pas seulement

actifs à un site spécifique, mais possède un potentiel pouvant générer une analgésie répandue dans le corps en entier. De plus, son action ne se limite pas seulement au niveau périphérique, mais serait aussi présente au niveau central par la capacité de ces composés à traverser la barrière hématoencéphalique (De Gregori et al., 2012). Ce transport par l'intermédiaire du système sanguin permet à la morphine et ses dérivés d'atteindre le système limbique et de modifier l'homéostasie du réseau dopaminergique mésolimbique pouvant ainsi mener au développement de dépendance (Dejean et al., 2013 ; Kim et al., 2016). Additionnellement, les effets secondaires aversifs engendrés par la prise de morphine ne se limitent pas à la dépendance par l'activation du système de récompense, mais auraient des effets répartis sur plusieurs systèmes physiologiques tels que le système respiratoire (dépression respiratoire), le système gastro-intestinal (constipation), le système endocrinien (dysfonction sexuelle, aménorrhée, dépression et apathie), le système immunitaire (immunosuppression), le système cardiaque (hypotension) ainsi qu'une combinaison de différents systèmes pouvant induire de la sédation, des troubles du sommeil, des troubles de la mémoire et bien d'autres (Khademi et al., 2016). Ces conséquences semblent s'intensifier à mesure que la prise d'agonistes mu perdure, puisqu'il y a apparition de tolérance (Oertel & Lötsch, 2008). Donc, pour produire un même effet analgésique l'individu doit augmenter la dose consommée. De ce fait, bien que les composés opiacés soient disposés à soulager la douleur aiguë, leurs effets secondaires les rendent inadéquats pour le traitement de la douleur chronique. Les effets secondaires indésirables seraient médiés par la voie  $\beta$ -arrestin2, car la délétion génétique de cette protéine chez une souris manipulée génétiquement (Knockout) renverse totalement ses contrecoups, en plus de produire une analgésie accrue. Ces effets seraient attribuables au rôle de la  $\beta$ -arrestin dans l'internalisation du récepteur (Raehal et al., 2011).

La distribution de ces récepteurs est toutefois incertaine, puisque les techniques de détection de ceux-ci sont rarement suffisamment précises ou spécifiques. En outre, les études exécutées, jusqu'à présent, ont principalement exploré leurs distributions sur des tissus de rongeurs. Les évidences recueillies, sur ces tissus, suggèrent qu'au niveau cérébral, le MOP aurait une expression plus diffuse que celui du DOP. En effet, le MOP serait surtout exprimé dans le cortex, le striatum, les noyaux basaux, l'amygdale, le thalamus, l'hypothalamus, les colliculi inférieur et supérieur, le noyau du faisceau solitaire, le noyau spinal du trijumeau et la substance grise périaqueducale (Mansour et al., 1988; McDonald & Lambert, 2015). En



contraste, le DOP aurait une présence essentiellement limitée au cortex, au striatum, aux noyaux basaux, l'amygdale, la substance grise périaqueducale et le bulbe olfactif (Mansour et al., 1988; Mennicken et al., 2003). Au niveau spinal, tous les deux auraient une expression plus marquée aux couches I-II. En similitude, au niveau des afférences primaires, ils auraient aussi tous deux une expression présynaptique. En revanche, leur distribution dans les afférences primaires pourrait être différente. Présentement, les évidences accumulées suggèrent deux possibilités soit MOP et DOP seraient uniquement distribuées dans différents nocicepteurs (Scherrer et al., 2009) soit MOP et DOP partageraient une même expression pour tous types de fibre confondus, avec possiblement une légère coexpression cellulaire (Mennicken et al., 2003; Rau et al., 2005; H. Wang & Wessendorf, 2001). La première théorie propose que le MOP est essentiellement exprimé dans les nocicepteurs peptidergiques non-myélinisés menant à la transmission principale de la douleur d'origine thermique et que DOP se situerait dans les fibres nociceptives myélinisées et non-myélinisées non-peptidergiques, menant à la transmission essentiel de signal nociceptif d'origine mécanique. La deuxième théorie propose que le DOP aurait aussi la capacité à inhiber la douleur d'origine thermique.

#### **RÉCEPTEUR OPIOÏDE DELTA**

Le récepteur opioïde delta a été largement étudié chez les rongeurs durant ces dernières années comme cible alternative potentielle pour le traitement de douleur chronique. Il est intéressant de constater qu'en contraste avec le MOP, certaines études suggèrent que l'activation du DOP produirait moins d'effets secondaires (Beaudry et al., 2009; Brandt et al., 2001; P. Y. Cheng et al., 1993; Codd et al., 2009; Cowan, 1988; Dondio et al., 1997; Feng et al., 2006; Gallantine & Meert, 2005; Hudzik et al., 2014; May et al., 1989; Petrillo et al., 2003; Porreca et al., 1984; Szeto et al., 1999). Ces études ont révélé une absence de constipation et de dépression respiratoire à la suite de leur activation par un agoniste opioïde delta. Cette découverte fait contraste avec les effets observés chez le MOP, tel que mentionné précédemment. Cependant, un effet secondaire considérable a été observé, la convulsion; ceci étant une conséquence de la réduction du seuil d'excitation des neurones GABAergiques dans le lobe préfrontal du cerveau (Chung et al., 2015). Par contre, certaines études suggèrent qu'aucune action pro-convulsivante n'a été observée à dose analgésique (Pradhan et al.,

2011 ; Snead, 1986) et que le développement d'agonistes delta vaut la peine d'être approfondi. D'autre part, la revue de littérature produite par Pradhan et ses collègues (2011) propose que l'activation du DOP présente des effets anxiolytiques et antidépresseurs en plus de son analgésie, ce qui permettrait de s'attaquer non seulement à l'aspect physiologique de la douleur, mais aussi à l'aspect psychologique. Cette observation accroît l'intérêt dirigé vers l'exploration du récepteur DOP comme cible thérapeutique pour le traitement de la douleur, étant donné la comorbidité existante entre la douleur chronique et l'anxiété, la dépression et le stress (Goldenberg, 2010 ; Parent et al., 2012). Un bénéfice supplémentaire quant à l'utilisation des agonistes delta est leur utilisation contre les douleurs migraineuses qui a déjà été démontrée comme étant une thérapie prometteuse (Pradhan et al., 2014). Afin de produire une représentation juste des effets du DOP comparativement au MOP, il faut aussi noter que les drogues ciblant le récepteur DOP sont également soumises au phénomène de développement de tolérance, mais ne semble pas mené à une addiction (Pradhan et al., 2012).

De plus, l'activation du DOP en situation de douleur aiguë produit une analgésie bien moins importante que celui que produit le MOP (Gallantine & Meert, 2005), mais produit une analgésie similaire, voire même supérieure, en situation de douleur chronique (Cahill et al., 2003; Fraser et al., 2000; Gavériaux-Ruff et al., 2008; Hurley & Hammond, 2000; Nadal et al., 2006; Pradhan et al., 2009, 2010). Le récepteur DOP possède une distribution différente à travers les espèces. Chez la souris et le rat, le DOP est dispersé à travers le système nerveux avec de plus fortes concentrations dans la couche I et II de la corne dorsale de la moelle épinière et dans les ganglions rachidiens dorsaux (DRG). Les DRG sont les renflements retrouvés sur les afférences primaires près de la moelle épinière. Ils sont une agglomération des corps cellulaires des nerfs formant les afférences primaires. Cependant, le récepteur peut aussi être détecté dans le putamen, le noyau accumbens, le noyau caudé, le lobe temporal et l'hippocampe (Peng et al., 2012). Chez les humains et les autres primates, la présence du DOP dans le système nerveux est quasi exclusive aux afférences primaires, avec une présence du récepteur dans les couches I et II de la corne dorsale de la moelle épinière ainsi que dans les DRG. Mennicken et ses collègues ont étudié la localisation de ce récepteur par essais de liaison (autoradiographie) sur sections et d'hybridation *in situ* pour la détection de son ARN messager. Malgré la présence du récepteur DOP dans la moelle épinière humaine, son ARN messager est virtuellement absent. L'absence d'ARN messager

suggère que le récepteur est d'abord formé au niveau des DRG et ensuite transporté vers les terminaisons axonales des afférences primaires (Mennicken et al., 2003 ; Peng et al., 2012). Cette implication permet d'assumer que le récepteur est spécifiquement exprimé dans les faisceaux spinaux ascendants. Selon Mennicken, l'expression du DOP serait présente en plus grande proportion dans les neurones de petit ou moyen diamètre en ce qui concerne les DRG et les ganglions trijumeaux humains et des primates. Ceci fait contraste avec l'expression du DOP observée chez les rongeurs qui montre le récepteur dans toutes les fibres de la moelle épinière, sans distinction (Mennicken et al., 2003). Cette observation suggère que le DOP aurait un rôle plus important chez les primates que chez le rongeur en ce qui a trait à la régulation de la nociception en provenance des afférences primaires. Cette proposition est aussi soutenue par la présence accentuée du DOP dans les couches I et II de la moelle épinière chez les rongeurs, les primates et l'humain, comportant une plus forte concentration de terminaisons de fibres nociceptives A $\delta$  et C qu'ailleurs dans la moelle épinière.

Suivant la stimulation avec un agoniste, le DOP est phosphorylé sur la queue carboxy-terminale par les *G protein-regulated kinases* (GRKs) ce qui entraîne le recrutement de la  $\beta$ arr. La  $\beta$ arr produit alors une internalisation du récepteur par endocytose au moyen de vésicules mantelées ce qui laisse seulement qu'une très faible concentration de récepteurs à la surface de la membrane cellulaire (Bie & Pan, 2007). Suivant l'endocytose, le récepteur peut être recyclé ou dégradé. Malheureusement, le DOP est pour la plupart du temps dégradé par activation de la voie lysosomale (Finn & Whistler, 2001; Tsao & Zastrow, 2000; Whistler et al., 2002). Cependant, la proportion de récepteurs DOP présents à la membrane peut être augmentée par des injections régulières de morphine ou en présence d'inflammation chronique, ce qui entraîne une translocation à la membrane plasmique de façon dépendante du stimulus (Gendron et al., 2006 ; Zhang et al., 2006, 2015). L'effet de la morphine serait possiblement induit par une phosphorylation du résidu thréonine 161 de la seconde boucle intracellulaire par la kinase 5 cycline-dépendante (cdk-5) (Beaudry et al., 2015 ; Xie et al., 2009). Pour donner suite à l'effet de la morphine sur le DOP, certaines hypothèses ont été formulées dont une sur la possibilité d'une dimérisation du DOP avec le MOP (Décaillot et al., 2008 ; George et al., 2000 ; Gomes et al., 2000, 2004 ; Law et al., 2005 ; Rutherford et al., 2008). Ces hétérodimères se formeraient dans les compartiments du réticulum endoplasmique. Le recrutement des récepteurs MOP subséquent par la morphine,

entraîneraient une externalisation du récepteur DOP à la membrane causée par leurs liaisons (Gomes et al., 2000, 2004 ; Law et al., 2005 ; Liu et al., 2009). Même si cette possibilité n'a pas encore été confirmée, l'analgésie produite par le récepteur DOP serait tout de même régulée par le récepteur MOP (Gendron et al., 2007). L'interaction entre le DOP et le MOP a incité la création d'un composé mixte ciblant ces deux récepteurs comme traitement possible contre la douleur (Vardanyan et al., 2017). Pour ce qui est de l'augmentation du DOP observée à la surface membranaire à la suite d'une inflammation chronique, ceci dépend possiblement d'un changement au niveau de l'expression génétique dans les neurones des DRG qui favoriserait le trafic du récepteur à la membrane (Woolf & Salter, 2000). Les changements observés pourraient être produits par la surexpression de tachykinine dans les neurones de DRG de petits diamètres en augmentant la réserve intracellulaire disponible de DOP pour le trafic membranaire stimulus-dépendant (Zhang et al., 2006), une dépolarisation des neurones menant à l'externalisation via les vésicules d'exocytose (Bao et al., 2003; Commons et al., 2001; Commons, 2003; van Bockstaele et al., 1997; Zhang et al., 1998) ou bien la présence de facteur de croissance des nerfs (NGF) qui augmente l'expression de la neuropeptide excitatrice, substance P, et par le fait même celle du récepteur DOP, du moins en condition *in vitro* avec un modèle de cellules PC12 (Chen et al., 2006). Cependant, l'analgésie causée par l'activation du DOP au niveau spinal serait possiblement causée par la diminution de relâche de substance P, ce qui a été découvert par l'observation de l'internalisation du récepteur NK1 (récepteur de la substance P) (Beaudry et al., 2011 ; Koucek et al., 2013). Les agonistes DOP n'auraient cependant pas l'habileté d'interférer avec l'internalisation du récepteur NK1. Toutefois, il est aussi suggéré que la substance P ne jouerait aucun rôle dans l'inhibition de la douleur causée par l'activation du récepteur DOP (Dubois & Gendron, 2010).

Malgré les connaissances accumulées à ce jour sur la distribution du DOP dans les fibres afférentes, il demeure que certaines controverses perdurent quant à son expression et son rôle dans le contrôle de la douleur, mentionné ci-haut. En effet, certains maintiennent que le DOP possède des effets analgésiques bien spécifiques, soit une analgésie uniquement mécanique causée par sa présence accrue dans les nocicepteurs non-peptidergiques. En contraste, le MOP quant à lui aurait des effets analgésiques uniquement thermiques étant donnée sa distribution dans des fibres afférentes peptidergiques (Scherrer et al., 2009). Notre

équipe a, par multiples expériences et par différents expérimentateurs, constaté qu'il n'y avait pas de spécialisation de type de douleur pour chacun des récepteurs. Les deux possèdent une capacité d'analgésie pour chacune des sources (Normandin et al., 2013). Cependant, les techniques d'évaluation de la nociception ainsi que les modèles animaux utilisés pourraient être à la source de cette divergence. Le groupe de Scherrer a procédé par l'évaluation de la nociception thermique grâce à la technique du *tail-flick*, application de chaleur jusqu'à retrait complet de la queue, chez la souris, tandis que le groupe de Gendron a plutôt opté pour une immersion d'une patte arrière dans un bain d'eau chaude. Le groupe de Gendron a aussi rapporté antérieurement les mêmes observations au moyen d'un modèle inflammatoire causé par injection de Complete Freund's Adjuvant (CFA) chez le rat, c'est-à-dire la capacité du DOP à inhiber aussi la douleur thermique (Gendron et al., 2007). La différence quant au membre corporel choisi peut expliquer l'obtention de résultats distincts. Puisque dans les deux laboratoires le test mécanique de choix était le test de *Von Frey*, application de filament jusqu'au retrait du membre et qu'il a été exercé sur la patte arrière, il serait donc plus raisonnable de faire le test thermique sur les mêmes afférences. Toutefois, la différence observée par ces deux laboratoires pourrait tout aussi bien être expliquée ou peut avoir été accentuée par la différence du modèle animal utilisé dans l'exécution des expériences. Comme expliqué précédemment, la distribution et le taux d'expression des récepteurs MOP et DOP varie tout dépendant de l'espèce analysée, qui dans les cas présentés, varie entre la souris et le rat. Par exemple, chez la souris, le DOP semble être exprimé plus fortement dans les couches I-II que chez le rat. De plus, cette vision spécifique des rôles rattachés aux récepteurs aux opioïdes est très simplifiée étant donné qu'une grande population de neurones, plus de 50 % en provenance des DRG sont en fait polymodaux (Wang et al., 2018), ce qui désigne qu'ils sont sensibles à plusieurs stimuli à la fois variant entre mécanique, chimique et thermique.

#### SOURIS DE TRANSGENÈSE

Pour mieux identifier les différentes fonctions des récepteurs aux opioïdes plusieurs laboratoires procèdent à la création de lignées de souris (knockout, KO) qui permettent de supprimer l'expression du gène d'un récepteur spécifique afin de détecter les changements entraînés (Filliol et al., 2000 ; Reiss et al., 2017) ou encore éliminer l'expression des récepteurs aux opioïdes autres que le récepteur d'intérêt afin d'isoler les effets attribuables à

ce dernier (Yang et al., 2016). Quelques changements tels que l'ajout de sites de recombinaison, permet de produire un knockout conditionnel (KO(c)) en utilisant le système Cre-loxP (Gaveriaux-Ruff et al., 2011). Certains laboratoires décident quant à eux de modifier l'expression d'un récepteur en y associant une protéine identifiatrice (Pradhan et al., 2009, 2010 ; Scherrer et al., 2006, 2009). La protéine identifiatrice peut être un épitope ou bien une protéine fluorescente. Notre équipe a opté pour la stratégie d'un simple knockout (KO) en abolissant l'expression du récepteur opioïde delta par l'insertion d'une cassette d'arrêt devant le gène codant du DOP, *Oprd1*. Dans cette condition, il s'agit d'une souris avec exclusivement un phénotype KO et non un génotype KO; puisque le gène est toujours présent, mais son expression simplement réprimé par la cassette d'arrêt. Similairement à la technique mentionnée ci-haut pour générer des KO(c), notre technique exige que les sites de recombinaison (loxP) de part et d'autre de la cassette d'arrêt ce qui nous permet de produire une knock-in conditionnelle (KI(c)) par son croisement avec une souris exprimant une Cre-recombinase.

#### **SOURIS STOP-FLAGDOP**

Malgré la présence du gène responsable de l'expression du récepteur opioïde delta, *Oprd1*, cette souris exprime un phénotype KO. Ceci est causé par un arrêt de traduction de la protéine DOP. Cet arrêt de traduction est généré par l'insertion d'une cassette d'arrêt précédant le *Oprd1*.

En plus de cette cassette STOP, nous avons exploité la recombinaison homologue du système CRE-loxP mentionnée précédemment. En effet, la cassette STOP est encadrée de sites loxP qui sont des sites reconnus par la Cre-recombinase ce qui a permis le retrait de la cassette d'arrêt afin de permettre la réexpression du gène. Finalement, non seulement une cassette d'arrêt encadrée par deux sites loxP a été intégrée devant le gène, mais un tag FLAG, défini ci-dessous, a aussi été inséré au début de la séquence codante (Figure 2). Le tag a pour objectif de permettre la détection spécifique du récepteur puisque les méthodes de détection immunologique utilisées à ce jour ne permettent pas de déterminer, avec certitude et spécificité, la distribution des récepteurs aux opioïdes.

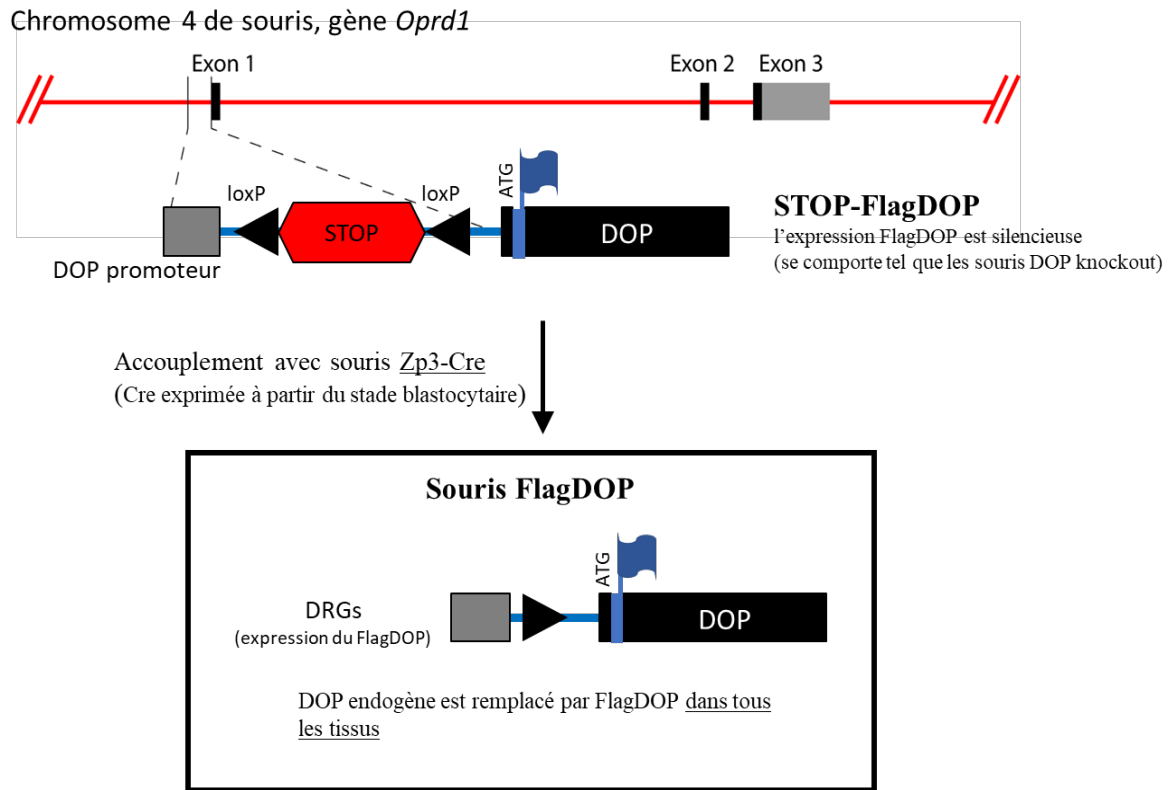


Figure 2 : Représentation schématique de la génération des souris STOP-FlagDOP et FlagDOP-KI(c).

Il devient alors intéressant d'utiliser le système Cre-loxP pour que le phénotype DOP-KO soit renversé et mener ainsi à la création d'une souris conditionnelle KI (FlagDOP-KI(c)).

## ÉPITOPE FLAG

L'utilisation de tags peptidiques non-fluorescents, tels que le FLAG, HA, HIS et bien d'autres sont communément répandues lorsque la protéine d'intérêt est désignée comme étant difficile à révéler par des méthodes de détection directe d'immunologie. En d'autres mots, l'anticorps développé contre le récepteur ne permet pas l'unique détection du récepteur, mais aussi d'autres antigènes provoquant ainsi des artéfacts qui peuvent mener à des conclusions hâtives. Le FLAG a tout d'abord été développé afin d'augmenter l'efficacité de purification de protéines recombinantes par chromatographie d'affinité. (Einhauer & Jungbauer, 2001; Knappik & Plückthun, 1994; Sloatstra, 1997). Ce rendement accru provient de la forte affinité que procure le tag avec son anticorps respectif. Cette technique d'ajout d'une protéine de fusion FLAG a par la suite été appliquée à plusieurs

autres techniques de détection *in vitro* (Hunter et al., 2016; Nagi et al., 2015; Tomkowicz et al., 2002; Tudashki et al., 2014; B. Yang et al., 2016). Le succès de cette technique en *in vitro* a inspiré son utilisation dans des modèles *in vivo* (Ferrando et al., 2015 ; Ikeda et al., 2017). D'autre part, l'utilisation d'un épitope afin d'obtenir un autre site antigénique devient essentielle pour la détection du DOP puisque les anticorps développés contre celui-ci se sont avérés peu spécifiques. En effet, le signal du DOP observé, par immunohistochimie, chez des souris delta knockout (Scherrer et al., 2009) ainsi que STOP-FlagDOP (Gendron, non-publié) étant le même que celui obtenu chez les souris de type sauvage, remet en doute la validité du signal détecté. L'ajout du tag FLAG, qui est un peptide composé de 8 acides aminés (DYKDDDDK) offre alors un potentiel de détection spécifique du récepteur. Il a été choisi de manière à diminuer les risques de compromettre le trafic ou les fonctions des protéines auxquelles il y est attaché contrairement aux protéines de plus grande taille qui ont déjà été utilisées (ex. green fluorescent protein, GFP). Cependant, les acides aminés le constituant sont chargés et pourraient tout de même influencer certaines fonctions des protéines. Toutefois, cette protéine de fusion offre en supplément une forte affinité causée par son résidu tyrosine qui facilite sa reconnaissance par les anticorps anti-FLAG et une grande solubilité qui préserve le repliement des protéines. De plus, cette protéine offre un site de reconnaissance pour l'entérokinase afin de la cliver du reste de la protéine d'intérêt (Hopp et al., 1988).

## **HYPOTHÈSE ET PROBLÉMATIQUE**

La grande majorité des recherches ciblant le récepteur opioïde delta *in vivo* se fait chez des modèles de type rongeur. Cependant, tel que mentionné dans l'introduction, plusieurs papiers citent les différences significatives d'expression du DOP entre les rongeurs et l'humain. Cette divergence pose un problème quant aux résultats qui peuvent être considérés généralisables à l'humain. Puisque le rongeur semble posséder de ces récepteurs à des endroits absents chez l'humain, il se peut que ceux-ci possèdent des fonctions inexploitable chez l'humain. Ce qui provoque un conflit potentiel lors de l'interprétation des résultats disponibles en ce moment. De plus, la littérature actuelle ne réussit pas à répondre à la question du niveau du rôle du récepteur opioïde delta concernant le contrôle de la douleur dans les fibres afférentes nociceptives. Cette question demeure importante puisque nos médicaments utilisés visent non seulement à remédier à la douleur au niveau



périphérique (afférences primaires), mais agissent aussi sur le système nerveux central (moelle épinière et cerveau) produisant en conséquence une série d'effets secondaires indésirables. Il devient donc primordial de démontrer que l'inhibition de la douleur produite, par l'activation des récepteurs DOP au niveau des afférences primaires, est suffisante en situation de douleur chronique. En créant une souris capable d'exprimer le récepteur uniquement aux endroits détectés chez l'humain, soit entre autres dans les afférences primaires, nous pouvons mettre en lumière les effets liés à la spécificité de la distribution dans le corps humain. De plus, ceci nous permettra de comprendre les répercussions qu'il pourrait y avoir quant au potentiel analgésique en situation de douleur chronique tout en déterminant s'il est possible ou non de produire une analgésie à la fois thermique et mécanique. En plus de déterminer la distribution du récepteur opioïde delta, nous pouvons aussi modifier l'expression de celui-ci afin d'exprimer l'épitope FLAG pour nous permettre de déterminer de manière définitive la distribution du DOP dans les fibres neuronales. Cette souris peut être créée à la suite du croisement de notre souris de type knock-out, STOP-FlagDOP, avec une souris *AdvillinCre*<sup>ERT2</sup>. Cette souris nommée *AvCre*<sup>ERT2</sup>:STOP-FlagDOP devient alors «humanisée».

## OBJECTIFS

### Objectif#1

Définir s'il y a présence d'analgésie à la suite de stimulations thermiques en situation de douleur chronique inflammatoire chez une souris «humanisée» ayant reçu une injection intrathécale d'un agoniste delta, deltorphine II.

La douleur chronique inflammatoire sera induite par une injection intraplantaire de Complete Freund's Adjuvants (CFA) dans la patte gauche suivi d'une période d'incubation de 72 heures. À la suite de cette période, le test de Hargreaves, application de chaleur jusqu'à retrait de la patte, sera effectué afin d'évaluer l'hyperalgésie associée à l'inflammation. Une injection intrathécale de deltorphine II (1 µg) entre les vertèbres lombaires 4 (L4) et 5 (L5) sera réalisée afin d'activer le récepteur DOP et ainsi potentiellement observer une analgésie. Les valeurs seront collectées à intervalles de 15 min (0, 15, 30, 45 et 60 min) par observation du temps de retrait de la patte ipsilatérale et controlatérale.

### Objectif#2

Définir s'il y a présence d'analgésie à la suite de stimulations mécaniques en situation de douleur chronique inflammatoire chez une souris «humanisée» ayant reçu une injection intrathécale de deltorphine II.

L'inflammation sera aussi induite par l'injection intraplantaire de CFA dans la patte gauche. Après 72 heures, la douleur mécanique sera évaluée par le test de *Von Frey* suivi d'une injection de deltorphine II intrathécale (1 µg) entre les vertèbres L4 et L5. Les valeurs sont collectées similairement à l'objectif #1, mais uniquement à la patte ipsilatérale, puisque le temps de demi-vie de la deltorphine II est très courte et qu'il ne nous permet simplement pas de prendre les mesures controlatérales. Les valeurs seront collectées à intervalle de 15 min (0, 15, 30, 45, et 60 min) par observation du temps de retrait de la patte ipsilatérale seulement.

### Objectif#3

Définir s'il y a présence d'analgésie à la suite de stimulations thermiques en situation de douleur chronique neuropathique chez une souris «humanisée» ayant reçu une injection intrathécale de deltorphine II.

La douleur neuropathique est induite quant à elle par une constriction chronique du nerf sciatique (CCNS), côté gauche. Après la période de repos, pour permettre le rétablissement à la suite de l'intervention chirurgicale (3 à 4 jours), l'évaluation de l'allodynie (hypersensibilité suite à l'exposition d'un stimulus non-nociceptif) se fera par l'intermédiaire du test de *Hargreaves* et d'une injection intrathécale de deltorphine II (1 µg) entre les vertèbres L4 et L5. Les valeurs seront collectées à intervalle de 15 min (0, 15, 30, 45, et 60 min) comme précédemment par observation du temps de retrait de la patte ipsilatérale et controlatérale.

### Objectif#4

Définir s'il y a présence d'analgésie à la suite de stimulations mécaniques en situation de douleur chronique neuropathique chez une souris «humanisée» ayant reçu une injection intrathécale de deltorphine II.

La douleur neuropathique est induite quant à elle par une CCNS. Après la période de repos de 3 à 4 jours, l'évaluation de l'allodynie se fera par l'intermédiaire du test de *Von Frey* et d'une injection intrathécale de deltorphine II (1 µg) entre les vertèbres L4 et L5. Les valeurs seront collectées à intervalle de 15 min comme précédemment par observation du temps de retrait de la patte ipsilatérale.

#### Sous objectif

Identifier par méthode de détection immunologique (immunohistochimie) l'antigène FLAG afin d'identifier les sites d'expression du récepteur DOP, ainsi que de sa répartition dans les fibres afférentes primaires, chez les souris FlagDOP et éventuellement les souris *AvCre<sup>ERT2</sup>:STOP-FlagDOP*.

## MÉTHODES

### SOURIS DE TRANSGENÈSE

Toutes les procédures exécutées ont été approuvées par le comité facultaire de la protection des animaux de la faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke (Protocole #242-18B). Ce protocole est en accord avec les directives éthiques du Conseil canadien de protection des animaux (CCPA) ainsi que de l'*International Association for the Study of Pain* (IASP). Toutes les souris utilisées dans cette recherche ont été maintenues sous un cycle de lumière de 14 heures (Ouverture des lumières à 6 a.m. – fermeture des lumières à 8 p.m.) avec une température régulée à 22 °C. Les souris ont eu libre accès à l'eau et à leur nourriture. Du matériel d'enrichissement de milieu tels que de petites huttes en plastique rouge autoclavable et des carrés de Nestlet® ont été utilisés.

#### Souris FlagDOP-KI(c)

Le système Cre-loxP se sert d'une action enzymatique provenant de la Cre recombinase afin d'exciser tout le contenu se trouvant entre deux sites loxP. La Cre recombinase est fournie par le croisement d'une souris *zona pellucida 3* (*Zp3*-Cre) avec une souris STOP-FlagDOP. Le *Zp3* représente le promoteur qui dirige l'expression de la Cre recombinase exclusivement au stade blastocytaire dans les oocytes en développement avant la complétion de la première division méiotique. Ce croisement *Zp3*-Cre:STOP-DOP exprimant la Cre-recombinase au stade blastocytaire permet la réexpression de la protéine DOP de manière généralisée dans le système nerveux de la souris comme montré par des essais d'autoradiographies sur sections exécutés par des membres de mon laboratoire (résultats non-publiés). La liaison du ligand radioactif <sup>125</sup>I-deltorphine aux récepteurs DOP sur des tranches de tissus de souris FlagDOP-KI(c) produit un signal identique au signal observé sur le tissus de souris de type wildtype. Donc l'expression du DOP dans le cerveau de la souris FlagDOP-KI(c) serait équivalente à celle observée chez la souris de type sauvage. Toutefois, on note une absence complète de signal provenant du ligand radioactif sur les tranches de tissus de souris STOP-FlagDOP. Additionnellement, l'épitope FLAG ajouté au récepteur DOP ne modifie pas la cascade signalétique produite par l'activation du récepteur comme a montré notre essai de GTPγS (résultats non-publiés).

Cet essai nous permet d'observer sur des tranches de bulbe olfactif l'absence d'activité de la protéine G, puisque la deltorphine II ne peut pas se lier aux récepteurs DOP absents chez la souris STOP-FlagDOP. En revanche, la souris FlagDOP-KI(c) montre une augmentation de la liaison du GTP $\gamma$ S à la suite de la stimulation avec la deltorphine II, tel observé chez le wildtype. Il faut aussi noter que le FLAG est bien exprimé avec le DOP puisqu'il permet son immunoprécipitation. Nous observons la précipitation de deux bandes (~65 kDa et 50 kDa) chez la souris FlagDOP-KI(c), mais d'une seule bande chez la souris STOP-FlagDOP (~65 kDa) et wildtype. Cette bande serait possiblement le résultat d'une liaison de l'anticorps anti-Flag à une protéine endogène avec une séquence de protéine ressemblant fortement au Flag (Résultat non-publié).

#### Souris *AvCre<sup>ERT2</sup>*:STOP-FlagDOP

Afin de reproduire chez la souris l'expression du DOP observée dans les tissus nerveux humains (du moins au niveau spinal), nous avons eu recours à une souris développée dans le laboratoire de John Wood et distribuée par Jackson Laboratory. Cette souris nommée *AdvillinCre<sup>ERT2</sup>* [*AvCre<sup>ERT2</sup>*] (Stock No : 032027) exprime une Cre recombinase uniquement dans les neurones sensoriels ainsi que les DRG grâce au promoteur *advillin*. De plus, cette Cre recombinase est inductible par l'injection de Tamoxifène grâce à sa fusion à un récepteur œstrogène humain modifié qui ne reconnaît pas l'œstrogène endogène. Une fois le ERT2 activé par le Tamoxifène, la Cre recombinase, qui est séquestrée au niveau du cytoplasme, gagne accès au noyau et du même fait à l'ADN. Les souris, à environ 2 mois postnatals, sont injectées une fois par jour pendant 5 jours consécutifs dans le péritoine avec 2 mg de Tamoxifène (20 g/mL) (Lau et al., 2011). Un délai de deux semaines après la dernière injection est fixé avant d'entreprendre les tests comportementaux. Le croisement de la *AvCre<sup>ERT2</sup>* avec notre lignée de souris STOP-FlagDOP permet d'initier l'excision des cassettes d'arrêt préférentiellement dans les DRGs et neurones sensoriels, en d'autres mots, dans les afférences primaires (Figure 3). De plus, le caractère d'inductibilité de la Cre recombinase

permet de se servir de souris  $AvCre^{ERT2}:STOP\text{-}FlagDOP$  non injectées au Tamoxifène comme souris contrôles.

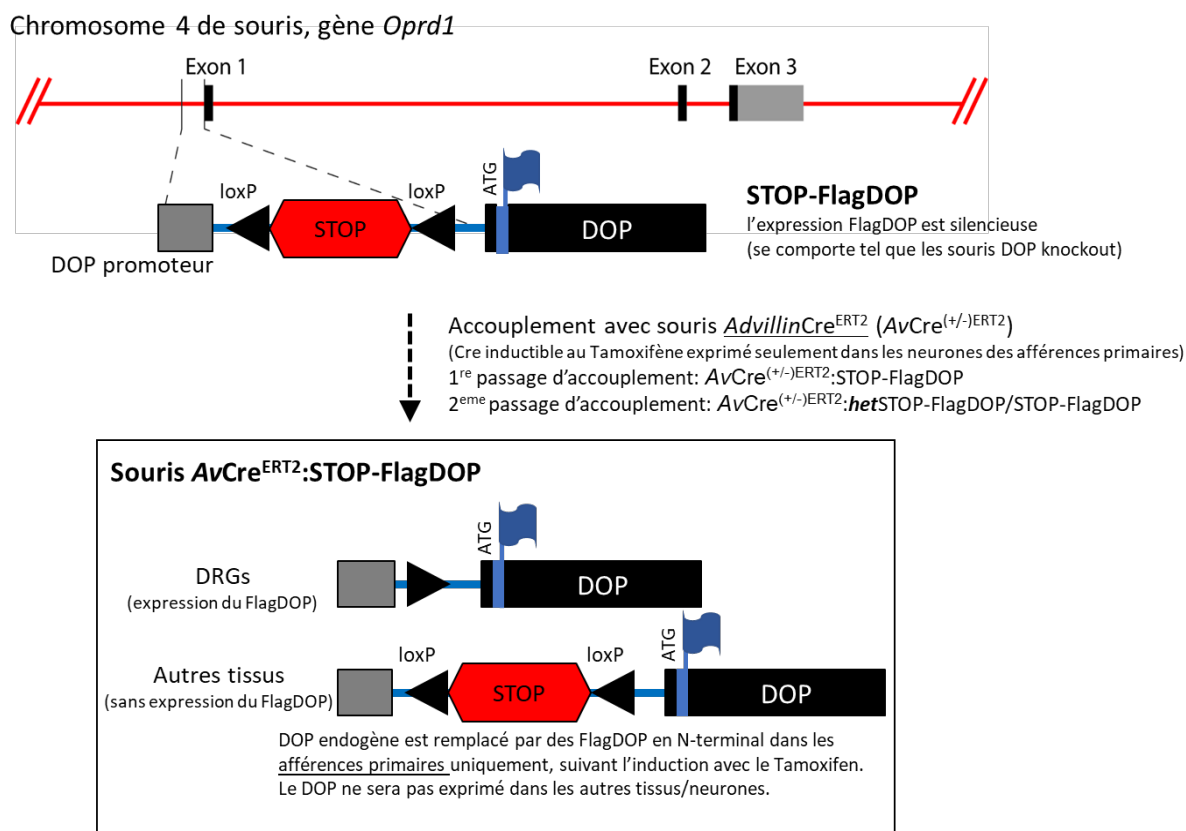


Figure 3 : Représentation schématique de la génération des souris  $AvCre^{ERT2}:STOP\text{-}FlagDOP$ .

### $ROSA^{nT/nG}$

Bien que la caractérisation de la souris *AdvillinCre* démontrant l'expression préférentielle dans les neurones sensoriels périphériques avec une expression limitée dans des cellules papillaires, des ganglions vestibulaires, des noyaux de second ordre, ainsi que la région tegmentale ventrale du mésencéphale (Zurborg et al, 2011) ait été réalisée, il nous faut aussi le vérifier dans notre lignée. L'utilisation d'une souris reportrice ( $ROSA^{nT/nG}$ ), obtenue de chez Jackson Laboratory (Stock No :023035), nous permet d'établir le patron d'expression de la Cre recombinase. La souris  $ROSA^{nT/nG}$  exprime une protéine fluorescente verte (eGFP)

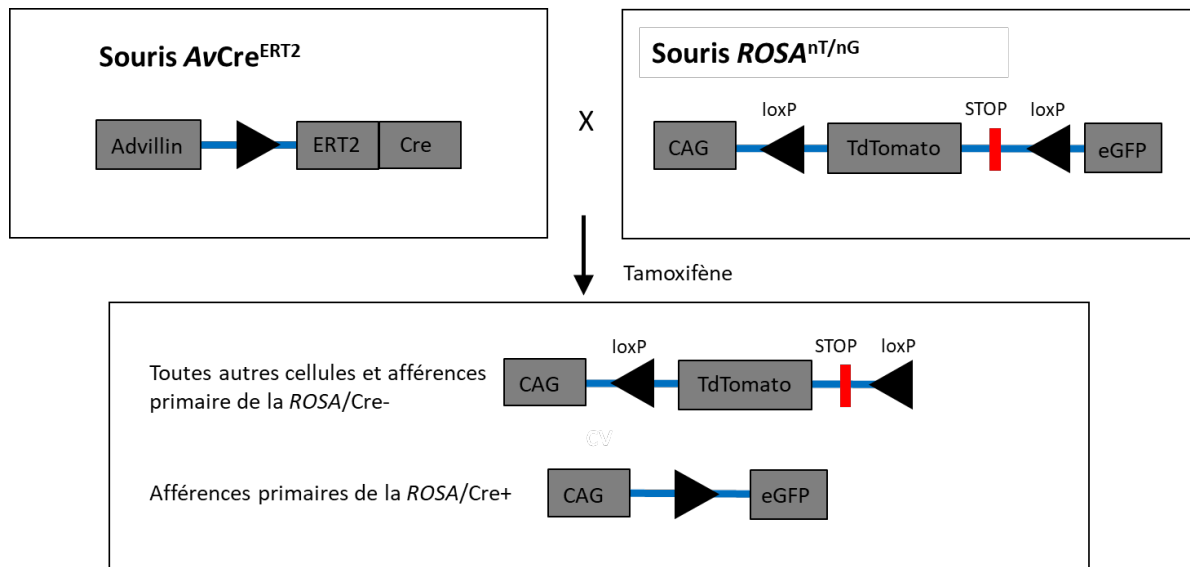


Figure 4 : Représentation schématique du croisement de nos souris *AvCre<sup>ERT2</sup>* avec la souris *ROSA<sup>nT/nG</sup>*.

en présence d'action de Cre recombinase et en son absence, elle exprime une protéine fluorescente rouge (tdTomato) au niveau nucléaire (Figure 4).

Le changement est causé par une délétion de gène codant pour le tdTomato en présence de la Cre recombinase en utilisant le système Cre-Lox. La séquence de protéine tdTomato débute après le promoteur CAG et est entourée de part et d'autre de sites loxP. Elle est ensuite suivie de la séquence protéique eGFP. Le retrait de la séquence protéique tdTomato initie l'expression de la eGFP. À l'aide de cette lignée de souris, nous serons en mesure de déterminer avec précision si nous pouvons observer la même expression que trouvée précédemment. De plus, son croisement avec une souris *AvCre<sup>ERT2</sup>* permettra ainsi de confirmer que notre protocole d'induction de la Cre recombinase au Tamoxifène est optimal pour inciter le transport de l'enzyme vers le noyau.

La souris *ROSA<sup>nT/nG</sup>*, obtenue de chez Jackson Laboratory a été accouplée à la souris *AvCre<sup>ERT2</sup>*, puis sa progéniture a été génotypée. Un nombre équivalent de souris exprimant la Cre recombinase ou non a été conservé afin de procéder à la visualisation microscopique. Une série d'injections au Tamoxifène, comme indiqué ci-dessus, a été faite lorsque les souris ont atteint 8 semaines. Après deux semaines post-injection, les souris ont été euthanasiées à la suite d'une anesthésie générale à l'isoflurane et les tissus récoltés.

## **COLLECTE DE TISSUS ET FIXATION**

Seuls le cerveau, la moelle et les DRGs sont récoltés pour la réalisation du projet. Pour les tissus frais congelés, les souris sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane (Baxter Corporation, CA2L9100) et ensuite décapitées. Le cerveau et la moelle épinière sont récoltés dans les plus brefs délais et déposés dans des nacelles sur de la glace sèche. Lorsque congelés, les tissus sont placés dans des tubes Eppendorf ou Falcon. Pour les tissus fixés et congelés, les animaux sont aussi anesthésiés à l'aide d'isoflurane et sont ensuite perfusés par le cœur avec une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4 %. Avant de procéder à la perfusion de PFA, le sang est retiré par le passage de 5 mL de saline 0,9 %. 20 mL de la solution de PFA 4 % sont ensuite intégrés afin de fixer le tissu et de préserver la morphologie du tissu. À la suite de la perfusion, les tissus sont récoltés et déposés dans des Eppendorfs remplis de PFA 4 % pendant 24 heures pour les DRGs et les moelles épinières et pendant 48 heures pour les cerveaux. Le PFA 4 % sera ensuite changé pour une solution de sucrose 30 % pendant 72 heures ou jusqu'à ce que le tissu coule au fond du tube. Le tissu ainsi cryoprotégé est congelé instantanément par immersion dans de l'isopentane refroidi à -80°C et maintenu sur glace sèche. Les tissus sont immergés dans l'isopentane jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de bulles qui se forment. Une fois congelés, les tissus sont déposés dans des Eppendorfs identifiés et déposés au préalable sur la glace sèche. Les Eppendorfs sont ensuite mis en entreposage à -80°C jusqu'à l'utilisation des tissus.

## **CLARIFICATION DE TISSUS**

La visualisation des tissus peut s'avérer ardue étant donné son opacité. Pour surmonter cet obstacle, la majorité des chercheurs procède en produisant des coupes mécaniques à l'aide d'un microtome, d'un cryostat ou d'un vibratome. Ces coupes ont le malheureux inconvénient de produire des bris tissulaires et par conséquent créer des artéfacts pouvant mener à une analyse erronée. Pour remplacer les coupes mécaniques nous avons recours aux coupes optiques, mais ceci nécessite qu'on élimine l'opacité des tissus causant la déviation de la lumière ou sa réfraction par des protéines, lipides et déchets organiques. Plusieurs méthodes de clarification des tissus sont développées afin d'éliminer les agents réfracteurs donc l'hyperhydratation, l'enchâssement par hydrogel, la clarification à base d'eau et la clarification à base de solvants. Deux techniques ont été tentées dans cette étude :



soit l'enchâssement par hydrogel (CLARITY) (Du et al., 2018; Jensen & Berg, 2017) ainsi que la clarification à base de solvant (uDISCO) (Li et al., 2018; Wan et al., 2018).

CLARITY a comme but premier de stabiliser les protéines en créant un réseau enchevêtré. Ce réseau est formé d'une interaction entre le formaldéhyde et l'acrylamide et permet l'élimination des lipides et des déchets organiques tout en conservant les protéines. Les lipides et déchets organiques peuvent être éliminés au moyen de détergents offrant ainsi une meilleure transparence en réduisant la déviation de la lumière. La réfraction de la lumière au travers du tissu est abolie par l'immersion complète dans un liquide possédant un indice de réfraction similaire à celui du tissu. Cette technique est à la base lente et requiert du matériel supplémentaire dispendieux. L'enchâssement par hydrogel a été amélioré au cours des dernières années et les appareils facilitant le processus ont été commercialisés sont maintenant beaucoup plus abordables. Cependant, ceux-ci nécessitent des tampons uniquement disponibles chez le fournisseur et dont les recettes sont sous brevets. Les tampons peuvent ainsi se révéler très coûteux. La clarification par enchâssement peut permettre l'immunohistochimie à la suite du traitement de clarification afin de repérer les protéines d'intérêt. De plus, l'absence de solvant dans cette technique en fait une approche de choix puisque les tissus demeurent alors compatibles avec la plupart des objectifs requis pour l'imagerie microscopique.

uDISCO ne fait pas de réseau enchevêtré, mais va déshydrater le tissu pour ensuite en extraire les lipides. S'ensuit une homogénéisation générale de l'indice de réfraction. L'action des solvants est très rapide ce qui est un atout lorsque nous travaillons avec des protéines fluorescentes. Plus l'exposition à la lumière est prolongée, moins le signal fluorescent est important, photoblanchiment. Un aspect supplémentaire intéressant est le rétrécissement des tissus, tout en conservant leur ratio respectif, les rendant plus facile à visualiser sous différents microscopes lorsque la taille initiale du tissu est importante. En plus, la qualité de la clarification est excellente. Cette technique a pourtant une limite significative, la présence de solvant est très dangereuse pour les objectifs de microscope, car elle pourrait les dissoudre partiellement les rendant ainsi inutilisables. Il faut donc créer une barrière ou un contenant à notre tissu pour protéger les objectifs, ce qui pourrait

potentiellement réduire la qualité de la clarification si le matériel retenu pour la formation du contenant ne correspond pas à l'indice de réfraction de la solution utilisée.

Ces deux méthodes sont d'intérêt pour le projet afin de visualiser les réseaux neuronaux impliqués dans la douleur au niveau des afférences primaires. Elles peuvent aussi servir à identifier les signaux obtenus par la souris reportrice.

La méthode de clarification par enchâssement d'hydrogel a été utilisée pour ce projet afin de retirer les lipides pouvant camoufler l'épitope FLAG. Cette technique permettant d'éliminer tous les lipides d'un tissu de façon généralisée sans avoir recours à des enzymes de digestion est intéressante. Cette technique intervient dès les premières étapes de la collection des tissus. Le tissu est nettoyé par perfusion avec du PBS 1X à 4 °C et fixé avec la solution d'enchâssement à l'hydrogel (concentration finale : 4 % acrylamide, 0,05 % bis-acrylamide, 0,25 % VA044 initiateur thermique, 4 % PFA, 1 % PBS 10X) aussi conservée dans la glace. Le tissu est prélevé rapidement afin d'éviter la polymérisation du gel et immergé dans une solution d'enchâssement à l'hydrogel pendant 3 jours à 4 °C. La polymérisation s'ensuit sous vide avec le système d'hybridation tissu-gel (EasyGel) de *LifeCanvas Technologies* pendant 3 heures à 37 °C sans agitation. Puis le tissu est retiré de l'hydrogel solidifié en frottant délicatement avec les doigts protégés préalablement avec des gants de protection. Les surplus restants d'hydrogel peuvent être retirés du tissu avec l'usage de *Kimwipes*. Le tissu doit par la suite être nettoyé avec deux lavages de PBS et gardé à température pièce jusqu'à la clarification du tissu.

La clarification peut être produite par voie passive ou active. La voie passive requiert que le tissu soit immergé dans la solution de clarification (1,24 % acide borique, sodium dodecyl sulfate (SDS) 4 %, pH 8.5 (par ajout de NaOH)). Le tissu avec sa solution de clarification dans un tube Falcon de 50 mL (Fisher, cat. # 14-432-22) est déposé dans la machine de traitement d'échantillon multifonctionnelle (EasyClear) de *LifeCanvas Technologies* à 37 °C avec une agitation faible pendant une durée variant d'une journée à 2 semaines dépendant de l'épaisseur du tissu. La voie active nécessite un appareil d'électrophorèse (SmartClear I) de *LifeCanvas Technologies*. Cet appareil permet de réduire le temps d'immersion du tissu dans la solution de clarification et ainsi optimiser la pénétration de ce dernier au travers du tissu. La voie active est plus efficace lors de la

clarification de tissu épais, mais elle est très dispendieuse. Deux tampons sont requis pour la clarification active, un tampon de clarification (Type A) ainsi que d'un tampon de refroidissement (Type B). La clarification complète d'un cerveau de souris demande en moyenne 5 jours. En présence de protéine fluorescente exprimée de manière endogène dans le tissu, le temps de manutention doit être limité de sorte à éviter l'exposition prolongée à la lumière. Alors, l'utilisation de la voie active dans cette situation devient inévitable, surtout lorsque des étapes d'immunohistochimie sont nécessaires suivant la clarification. Il est important de noter que le tissu ne peut être congelé sans avoir préalablement été immergé dans une solution de cryoprotection. Pourtant, ni une cryoprotection avec une concentration supérieure (80 %) de sucrose ou de glycérol n'a réussi à produire une cryoprotection suffisante à la congélation.

La méthode utilisée dans le cadre de la détection de l'épitope FLAG est la suivante : avant la clarification du tissu, le cerveau de souris a été coupé en tranches de 200 µm d'épaisseur. La clarification a été produite par voie passive pendant une nuit à 37 °C dans un tubes Falcon de 50 mL. Pour l'immunohistochimie en coupes flottantes, les tissus sont lavés 3 fois dans du PBS 1X et bloqués pendant une heure dans un tampon de blocage (0,3% Triton X-100, 3% m/v albumine de sérum bovin (BSA), 5% NGS dans du PBS 1X). À la suite du blocage, les tissus sont incubés avec l'anticorps primaire (0,3% Triton X-100, 1% m/v BSA, 3% NGS) dans du PBS 1X avec l'anticorps anti-FLAG polyclonal de lapin (1:500) et l'anti-GFAP monoclonal de souris (1:500) (Cedarlane, cat.# CLSG80195, lot # I076) pendant 3 heures à température pièce. Ensuite, les tissus sont lavés 3 fois au PBS 1X et incubés dans l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à l'Alexa Fluor 568 (Life technologies, ref.#A11011, lot # 1705911) et l'anticorps de chèvre anti-souris couplé à Alexa Fluor 405 (Life technologies, ref.#A31553, lot # 1711490) pendant 2 heures à température pièce suivie de trois lavages de cinq minutes. Les images ont été recueillies par microscopie confocale.

## **GÉNOTYPAGE**

### Extraction de l'ADN

Pendant le sevrage des souris, un extrait d'oreille est prélevé avec des ciseaux et des pinces décontaminés avec une solution de DNA Away® (Fisher, cat. # 21-236-28) et déposé

dans un tube SST Vacutainer (VWR, cat. # 367 986). L'échantillon est ensuite mis à lyser pendant la nuit dans 500 µL de tampon de lyse (NaCl 0,27 M, SDS 0,45%, Tris HCl 9 mM pH 8.0, EDTA 2 mM) et 15 µg de protéinase K dans un bain à 56 °C avec faible agitation. Après la lyse, 500 µL de phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25:24:1, Sigma, cat. # P-3803) sont ajoutés au tube et ce tube est agité au vortex pendant 15 secondes. Il est ensuite centrifugé pendant 15 min avec une force de 2000 g à 4 °C. 500 µL de chloroforme : alcool isoamylique (24:1) sont ajoutés au tube, puis il est agité au vortex pendant 10 secondes et centrifugé avec les mêmes paramètres que la première fois. Le contenu des tubes SST Vacutainer est transféré dans un Eppendorf de 1,7 mL préalablement identifié contenant 50 µL de sodium acétate 3M pH 5.2. Après le transfert, 750 µL d'éthanol 100 % (Rose Scientific, cats. # IB15720) ultrapur froid (-20 °C) sont ajoutés à l'Eppendorf et agités avant d'être mis à centrifuger pendant 15 min à 13 000 RPM à 4 °C. Le surnageant est retiré en portant attention de ne pas retirer le culot. Cette fois, 200 µL d'éthanol 70 % ultrapur froid (-20 °C) sont ajoutés à l'Eppendorf, agités et centrifugés pendant 10 min. Le surnageant est aspiré, tout en évitant d'y retirer le culot. L'Eppendorf est laissé à sécher sous une hotte pendant environ 30 min. Ensuite 75 µL de RNase (0,01 mg/mL) sont ajoutés. L'Eppendorf est maintenant transféré à 4 °C pendant la nuit afin de permettre à l'ADN de se dissoudre. Le dosage est effectué le lendemain et le tube est conservé dans un congélateur à -20 °C.

### RT-qPCR

Suite à l'obtention de la souris *AvCre<sup>ERT2</sup>*, The Jackson Laboratory publia un communiqué stipulant que l'allèle permettant l'expression de la Cre recombinase était très faiblement transmissible. De plus, les copies du transgène codant pour la Cre recombinase étaient décroissants et instables. Pourtant lors de la vente, ces souris ont été rapportées avec un nombre de copies stables. Pour vérifier cette affirmation, nous avons produit des réactions de polymérase en chaînes quantitatives en temps réel (RT-qPCR), nous permettant à la fois d'identifier les souris portant l'allèle Cre et son nombre de copies dans les souris *AvCre<sup>ERT2</sup>:STOP-DOP*. Les amorces liées avec des sondes fluorescentes rouges pour le contrôle interne (IC) et vertes pour le transgène (TG) produites par *PrimeTime* (0,15 µM chaque) sont combinées à 200 ng d'ADN (5 µL) et 10 µL de Master mix 2X pour un volume total de 20 µL. Le RT-qPCR est lancé avec les paramètres initiaux de 95 °C pour 3 min, suivi

de 40 cycles alternant entre 95 °C pendant 3 secondes et 60 °C pour 30 secondes. Les photons émis par la sonde sont perçus par le moniteur et traduits en graphique. Les données obtenues permettent de déterminer par rapport à un individu contrôle le nombre de copies du transgène en calculant la valeur du delta Ct double ( $\Delta\Delta C_t$ ). Le changement de grandeur d'expression est obtenu à la suite de la conversion par cette équation,  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Une souris de type sauvage nous a servis de contrôle négatif tandis qu'une souris  $AvCre^{ERT2}$  de première génération, de contrôle positif.

#### Migration sur gel d'agarose

Suivant la PCR, le résultat de la transmission du transgène est vérifié par migration sur gel d'agarose de 2 %. Le colorant d'ADN pour gel SYBR® Safe (1:10 000) est ajouté au gel avant solidification. La solution d'ADN est mélangée à une solution colorante de chargement (1:6) pour ensuite être déposée dans les puits. La migration se fait à 120V pendant 45 min. Le gel est par la suite visualisé au moyen d'une lampe UV et du système de visionnement Geldoc de Biorad. La détermination du génotype concernant l'allèle codant pour la STOP-DOP a été analysée par la plateforme d'analyse d'ARN situé au PRAC du campus de la santé de l'Université de Sherbrooke.

### **SECTION DE TISSUS**

#### Microtome

Les coupes mécaniques de tissu sont bien plus populaires que les coupes optiques pour la simple raison que la distribution 3D est souvent superflue pour répondre aux besoins de nos projets. Les coupes mécaniques sont aussi pratiques et économiques, elles demandent moins de temps de prétraitement du tissu, accroissent la surface de perméabilisation pour l'absorption des anticorps et minimisent les coûts associés au volume d'anticorps nécessaires. Afin de vraiment minimiser le volume d'anticorps utilisé, beaucoup de chercheurs préfèrent procéder à une immunohistochimie sur coupes flottantes. L'outil permettant la réalisation de ces coupes flottantes est le microtome. Sa lame est mobile, mais son plateau où repose le tissu ne l'est pas. La lame est maintenue à la température pièce et seul le podium est gardé à -20 °C. Cet appareil est davantage utilisé avec des tissus congelés de taille moyenne tels que le cerveau de souris ou de rat, mais peut aussi réaliser des coupes

sur des tissus congelés de plus petit diamètre avec une longueur raisonnable comme la moelle épinière. Il faut noter que cet appareil fonctionne préférentiellement avec des tissus fixés. Les coupes devront être manuellement déposées sur une lame après l'immunohistochimie. (Leica SM2000R, Leica Biosystems Inc.).

### Cryostat

Lorsque nous travaillons avec des tissus de très petite taille comme le bulbe olfactif ou bien les DRGs, l'utilisation du microtome n'est pas recommandée. La lame étant trop chaude causerait la décongélation du tissu, le rendant sensible et fragile à la force de celle-ci. Travailler avec des tissus congelés, soit frais ou de petite taille, nécessite un appareil appelé cryostat, qui conserve l'environnement proximal de travail à une température pouvant varier entre -10 °C et -30 °C. La lame, contrairement au microtome, est immobile et son podium est déplaçable et adaptatif. Le milieu froid permet de conserver la coupe en une feuille bien lisse afin de pouvoir la déposer directement sur une lame. Cet appareil permet de réaliser des coupes plus minces que le microtome. (Leica CM1860, Leica Biosystems Inc., Concord, ON, Canada)

### Vibratome

Lors de l'utilisation du tissu non congelé, l'appareil recommandé est le vibratome. Sa lame est mobile et automatisée permettant une plus grande précision de la coupe. Cette précision est nécessaire lorsque nous manions des tissus fragiles et non fermes.

## **IMMUNOHISTOCHEMIE**

Plusieurs techniques existent pour la détection de protéines sur tissu, mais la plus communément utilisée est l'immunohistochimie. Cette approche est basée sur l'utilisation d'anticorps ciblant un antigène d'intérêt se situant sur la protéine. Lorsqu'un seul anticorps est utilisé, il s'agit d'une immunohistochimie directe. En revanche, lorsque la protéine est très peu abondante, il faut utiliser des méthodes de détection indirecte, c'est-à-dire l'utilisation de deux anticorps soit un anticorps primaire non conjugué et un anticorps secondaire conjugué à une sonde fluorescente, une biotine ou un reporteur enzymatique. La révélation par fluorescence présente le moins grand facteur d'amplification, car chaque anticorps ne possède qu'un seul fluorophore, donc il y a seulement le relâchement d'un

photon ou deux par antigène si l'on considère l'utilisation d'anticorps secondaire. La solution est d'utiliser un reporteur enzymatique qui produit plusieurs dépôts colorés par antigène ou encore de choisir un anticorps secondaire avec biotine qui peut se lier fortement avec l'avidine permettant la liaison d'un complexe avidine-biotine contenant plusieurs enzymes reporteurs. Cette approche produit la meilleure amplification, mais requiert beaucoup plus d'étapes et de lavages et peut donc créer des dommages aux tissus.

L'anticorps primaire doit idéalement être produit dans un animal hôte différent de l'espèce étudiée. Pour quelques anticorps comme ceux de souris, certains ensembles de blocage permettent de bloquer les immunoglobulines (Ig) des souris ainsi que les récepteurs Fc (protéine située à la surface membranaire possédant une forte affinité pour une grande diversité d'anticorps) situés sur les cellules  $\beta$ , les cellules plasmiques et les macrophages afin de prévenir leur reconnaissance par l'anticorps secondaire. Ainsi l'anticorps secondaire anti-souris peut être utilisé chez la souris et devrait reconnaître spécifiquement l'antigène.

Autre que le choix des anticorps, des problèmes d'immunohistochimie peuvent venir de plusieurs sources telles qu'un blocage inapproprié provoquant du bruit de fond, un manque de perméabilisation qui peut réduire ou empêcher tout signal, un manque ionique dans les tampons de lavage (tel que pour l'anti-FLAG M1 qui est calcium-dépendant) ou encore l'acidité du tampon de lavage. Concernant les tissus perfusés, il est possible que les antigènes soient masqués par des liaisons covalentes produites par l'exposition au PFA. Dans le cas échéant, sa réexposition nécessite une étape de récupération d'antigène. Cette étape consiste à retirer les liaisons covalentes par l'exposition à une chaleur importante, pouvant provenir de micro-ondes, d'un four à pression, de fours communs, ou d'une solution acide.

Pour ce projet, il nous faut détecter l'épitope FLAG. Pour y arriver, nous avons utilisé des anticorps primaires anti-FLAG tels que l'Anti-FLAG lapin polyclonal (sigma, F7422, lot # 078M4886V), l'anti-FLAG chèvre polyclonal (Abcam, ab1257, lot # GR23736-19) et l'anticorps anti-FLAG de poulet (Immune Biosolutions, cat.# Y00004-002, lot# ZCB05000A-0 AA), ainsi que des anticorps secondaires avec biotine pour permettre sa liaison au complexe avidine-biotine (ABC) avec l'enzyme reporteur peroxydase de raifort (HRP). Cette combinaison est révélée par le diaminobenzidine (DAB) qui lorsqu'à proximité du HRP créera un précipité brun-noir. En plus des paramètres d'optimisation étudiés, nous

pourrions aussi essayé l'ajout d'une méthode de récupération d'antigène, la modification du tampon de lavage, constitué de tampon salin de phosphate (PBS) et d'une optimisation de la concentration d'ions ou bien de variation de pH. Une combinaison de sérum normal de chèvre (NGS) et d'albumine de sérum bovin a servi de solution de blocage.

La technique d'immunohistochimie a été utilisée sur des tissus frais congelés, fixés congelés, clarifiés ou désulfatés. Jusqu'à présent, l'analyse par microscopie permet deux observations : soit que l'utilisation de faibles concentrations d'anticorps primaire ne produit aucun signal, soit que l'utilisation de fortes concentrations conduit à l'apparition d'un signal non spécifique. Deux hypothèses peuvent alors être émises, soit que l'antigène est masqué ou bien que son affinité avec l'anticorps soit réduite. À la suite d'une revue de littérature, nous en sommes venus à la conclusion que le résidu tyrosine de l'épitope FLAG pourrait être sulfaté. Afin de répondre à cette hypothèse, nous avons eu recours à une digestion par sulfatase d'entrailles d'abalone, type VIII (CAS No 9016-17-5, Sigma). Les conditions d'immunohistochimie avec sulfatase type VIII (Sigma-Aldrich, CAS.# 916-17-5) essayées sont les suivantes : Ajouter du BSA ou du NGS dans le liquide de dilution pour la sulfatase, utiliser du Tris-HCl 0.1M pH 5.0 ou bien de l'acétate de sodium pH 5,2 au lieu du PBS 1X pH 7.4, une incubation de la sulfatase pendant 1, 2 ou 3 heures à 37 °C ou bien une incubation dans 1U, 2U ou 5U par lame.

En plus des travaux se rattachant à mon projet, il m'a été donné la possibilité de contribuer à un article scientifique d'un ancien étudiant du laboratoire (Abdallah et al., 2018) en réalisant une partie de l'immunohistochimie pour étudier la réexpression de FLAG-DOP dans notre modèle de souris knock-out. Les souris ont été injectées avec des adénovirus permettant de diriger une action Cre recombinase vers les afférences primaires en priorité chez des souris STOP-DOP. Malgré la présence de GFP avec l'adénovirus, le signal n'était pas assez fort pour la détection par microscopie épifluorescence. Une amplification par l'emploi d'un anticorps anti-GFP lapin polyclonal (GeneTex, cat.# GTX30266, lot # 821700780) et d'un anticorps secondaire chèvre anti-lapin couplé à l'Alexa fluor 588 (Life technologies, ref.#A11008, lot # 1761258) a été nécessaire.



## IMMUNOFLUORESCENCE SUR CELLULES

Avant de faire des études sur des tissus animaux, il est conseillé de faire de la détection sur cellules, puisque les cellules sont moins dispendieuses, elles sont faciles à étudier et ceci permet donc de réduire l'utilisation d'animaux. Lorsque les résultats obtenus sur cellules valident nos hypothèses, nous pouvons alors procéder à l'étude sur le tissu. Donc, afin de valider la pertinence de désulfater les épitopes FLAG, nous avons procédé à des tests sur des cellules stables HEK293 FLAG-DOP.

## MICROSCOPIE

### Épifluorescence

La microscopie à épifluorescence est un outil permettant la visualisation de marquage fluorescent. Elle permet d'imager des tranches de tissu jusqu'à 20 µm d'épaisseur. Il s'agit d'un faisceau de lumière qui illumine la tranche et est perçu par un objectif. La lumière transmise passe au travers de filtres permettant le passage de seulement une petite fraction du spectre assurant l'activation d'une couleur de sondes fluorescentes spécifiques. Le focus se fait seulement sur une très petite section du tissu ce qui rend ses alentours flous. Des techniques de déconvolution permettent de réduire le diamètre d'émission de lumière produite par chacun des photons afin d'assurer une lecture plus concise de l'image. Pour des tissus de grande surface ou des tissus possédant des sondes ou protéines fluorescentes avec un temps de vie faible, l'utilisation de ce microscope peut causer du photoblanchiment ce qui pourrait rendre le reste du tissu inexploitable.

La microscopie à épifluorescence nous a servi à produire les images permettant le comptage des cellules de DRGs exprimant le eGFP dans les souris *ROSA<sup>nT/nG</sup>*. Le microscope à épifluorescence, Leica DM4000, a permis de visualiser les immunohistochimies et les immunofluorescences sur cellules.

### Confocale

Lorsque les coupes sont plus épaisses et que nous avons besoin d'une plus grande résolution, il se vaut de considérer la microscopie confocale. Ce microscope permet d'illuminer qu'une petite surface à la fois à l'aide d'un diaphragme concentrant la lumière. Ceci minimise non seulement les risques de photoblanchiment, mais permet aussi d'obtenir une plus grande résolution en conservant seulement la lumière réfléchie au focus. Le

microscope utilisé pour l'obtention de certaines images en immunohistochimie avec fluorescence est le Olympus IX81 FV1000.

#### AUTORADIOGRAPHIE SUR SECTIONS

L'utilisation d'immunohistochimie n'est pas la seule technique permettant de déterminer la distribution d'une protéine. Se servant de l'affinité qu'un ligand a pour son récepteur peut nous permettre de le marquer. Dans le cas d'une autoradiographie, l'agent marquant est un élément radioactif qui est choisi en fonction de la formule et structure moléculaire du ligand. Pour ce projet, l'élément radioactif produit est l'iode  $^{125}$  marquant deux ligands. La deltorphine II (agoniste DOP) et le DAMGO (agoniste MOP) ont été radiomarqués afin de déterminer leurs différences quant à la distribution de leurs récepteurs respectifs. Les tranches sont ensuite déposées dans un étui d'exposition pour deux semaines avec un film *Carestream Kodak biomax MR*.

Le signal détecté provient du marquage de la radioactivité causant une émulsion au contact sur le film d'exposition. Alors le temps d'exposition dépend du temps de demi-vie de la source radioactive utilisée. Dans le cas présent, il s'agit de l' $^{125}$ I qui possède une demi-vie de 59,5 jours donc l'exposition pourrait facilement s'étendre jusqu'à 2 mois. Pour cette expérience, l'exposition est de seulement 2 semaines. Toutefois avant de procéder à l'exposition, il faut tout d'abord ajouter le ligand radiomarqué aux tranches de tissu (20  $\mu$ m) préalablement incubées dans une solution tampon de Tris (TBS) 50 mM pH 7.4, 0,5 % BSA et un coquetel d'inhibiteurs de protéases cOmplete, EDTA free (Roche). Les ligands radiomarqués,  $^{125}$ I-DLT I ou  $^{125}$ I-DAMGO (50 pM, chacun), sont incubés pendant une heure à température pièce et rincés 3 fois dans du TBS 50 mM et une fois dans de l'eau froide. Les tissus sont séchés et exposés avec des films *Carestream Kodak biomax MR* dans un congélateur à -20 °C (Figure 8). L'iodation des ligands, DLT I et DAMGO, est réalisée par la méthode "iodogène" (Fraker & Speck, 1978) à l'institut de Pharmacologie (IPS) de l'Université de Sherbrooke.

#### TESTS COMPORTEMENTAUX

Autre que la visualisation de la distribution des récepteurs DOP et MOP, il est d'intérêt spécifique pour le projet de réaliser une étude directe sur les fonctions du récepteur DOP dans notre modèle de souris *AvCre<sup>ERT2</sup>*. Deux modèles de douleur chronique doivent être

induits avant la réalisation du test de Hargreaves et de Von Frey le premier étant une douleur inflammatoire par injection intraplantaire de Complete Freund's Adjuvant (CFA; 1:1) dans la patte gauche arrière, le second une douleur neuropathique par la constriction chronique du nerf sciatique (côté gauche) au moyen d'une bague qui produit une pression autour du nerf sciatique.

### Hargreaves

À la suite de la production de douleur chronique par les moyens mentionnés ci-dessus, les souris sont testées pour la douleur d'origine thermique (hyperalgésie) à l'aide de test de Hargreaves. L'appareil consiste en une plateforme de verre surmontée sur laquelle reposent des boîtes transparentes. Entre chacune de ces boîtes se trouve un mur séparateur opaque pour éviter que les souris puissent s'influencer entre elles. En dessous de la surface de verre se trouve une lampe manuelle produisant un faisceau de lumière thermique. Avant le test, chaque souris est acclimatée aux boîtes pendant au moins trois jours consécutifs afin de réduire le stress associé à un nouvel environnement. La durée d'acclimatation peut durer entre 15 et 30 minutes, le temps que les souris deviennent calmes. Le temps d'émission du faisceau thermique est limité à 20 secondes pour éviter toutes brûlures. Le temps de retrait de la patte ayant été exposée au faisceau de lumière est alors recueilli. Ces valeurs sont collectées pour une première fois avant l'induction de la douleur chronique (ligne de base), avant injection de deltorphine II (pré-injection) et à chaque 15 minutes d'intervalle pour une durée de 30 minutes (post-injection). Les données sont ensuite rassemblées en un graphique.

### Von Frey

Ce test cible l'évaluation de l'allodynie générée à l'exposition d'un stimulus mécanique. Les animaux sont déposés dans des boîtiers transparents, séparés entre eux de panneaux opaques, afin d'éviter le biais d'influence. Ces boîtiers sont déposés sur un grillage surélevé permettant l'accès aux pattes avec le poil de Von Frey et la détection de la tension exercée par le poil. Les poils de Von Frey sont un ensemble d'outils possédant des fils de nylon de diamètres croissants. Ces différents diamètres produisent une gamme de pressions directement proportionnelles à la grosseur des fils. La mesure enregistrée correspond à la valeur associée au filament de Von Frey qui initie le réflexe de retrait. Une longue période

d'habitation est requise, puisque le test de Von Frey requiert que les animaux soient non seulement calmes, mais aussi immobiles. Si la souris demeure mobile, la tension sur le poil peut le faire glisser et entraîner des chatouillements incitant non seulement un réflexe de retrait non lié à de la douleur, mais pourrait aussi accroître sa sensibilité. Les souris ont été acclimatées à la salle et aux boîtes d'expérimentation pendant 5 jours consécutifs pour un minimum d'une heure suivi d'une contention d'une à deux minutes et puis remisent dans leur boîtier jusqu'à ce que les souris s'endorment (minimum 15 min). Entre chaque étape les souris doivent être manipulées directement avec les mains. Le filament doit rester courbé pendant 3 secondes pour chaque prise de donnée, tout en restant perpendiculaire à la patte. Seul le retrait de la patte pendant ces 3 secondes ou immédiatement suivant le retrait du filament est considéré comme un signal positif. À défaut de pouvoir observer ce signal de retrait de la patte, le signal est considéré comme négatif. La technique de Von Frey utilisée est le « 50 % threshold » pour déterminer la mesure à retenir. Premièrement, tous les poils de Von Frey, constitués de forces augmentant logarithmiquement, sont présentés en ordre croissant commençant par le plus petit calibre à un premier groupe de souris jusqu'à observation du retrait de la patte. Les filaments sont appliqués à coups de 5 poils consécutifs suivis d'une période de repos de 2 minutes et ces étapes sont répétées jusqu'à l'obtention d'un signal positif. Par la suite, quatre autres présentations de filaments s'ensuivront dans un ordre établi. Chaque signal positif (X) entraîne une sélection d'un filament plus petit tandis qu'un signal négatif (O) entraîne la sélection d'un filament plus gros. Donc, le premier filament suivant le premier signal positif doit être d'un filament plus petit que le précédent, et vice-versa. Le patron obtenu par ces cinq présentations est noté et conservé pour analyse. Le seuil de retrait de la patte (PWT, Paw Withdrawal Threshold) de ce premier groupe sert de point de repère pour la prise de données des autres souris. En général, les souris recevront comme première force l'équivalent de deux filaments plus petits que le PWT du premier groupe de souris, afin de minimiser l'exposition répétée aux poils. Le patron de réponse est converti en 50 % PWT par une méthode modifiée décrite par Dixon (1980) tenant compte des degrés de liberté liés à l'utilisation de 5 valeurs.

#### **SOURIS INJECTÉES AVEC VIRUS ADÉNOASSOCIÉ**

Dans cette expérience, deux voies d'injections sont explorées, intraplantaire et intrathécale. Les souris injectées par voie intraplantaire sont séparées en deux groupes, un

groupe injecté à 5 jours postnataux et l'autre à deux semaines (15 jours) postnatales. Les souris injectées par voie intrathécale ont reçu le virus (2.5 µl de AAV2/9-CBA-Cre-GFP (1.25–1.6 × 10<sup>13</sup> GC/ml)) à 25 jours postnataux. Les souris sont euthanasiées entre 2-3 mois post-injection. Le cerveau, la moelle épinière et les DRG sont recueillis afin d'être coupés en tranches de 20 µm d'épaisseur pour les DRGs et de 30 µm pour le cerveau et la moelle épinière au moyen du cryostat. Les tranches sont déposées sur des lames gélatinées et entreposées au congélateur à -20 °C jusqu'à analyse.

Les tissus utilisés pour l'exécution de ces expériences proviennent de souris STOP-FlagDOP injectées préalablement avec un virus simple brin adénoassocié recombinant (rAAV) de pseudotype 2/9 surexprimant la Cre recombinase fusionnée à la protéine fluorescente eGFP guidée par le promoteur de la β-actine de poulet (CBA) qui permet une expression résistante et prolongée (*rAAV2/9-CBA-Cre-GFP*). Ces injections ont pour objectifs de diriger la réexpression de la protéine DOP préférentiellement dans les DRGs. La répartition du virus dans les fibres nerveuses est observée par la microscopie à épifluorescence via la détection du eGFP.

Afin d'optimiser la visualisation de la fluorescence en provenance de eGFP, les tranches de tissus ont subi une amplification du signal par immunohistochimie. Les tissus sont tout d'abord bloqués et perméabilisés dans une solution de blocage (0,3 % Triton 100-X, 3% p/v, BSA, 5% NGS, PBS 0,1M) pendant 1 heure à la température pièce. Le blocage est suivi d'une incubation de 16 heures à 4 °C avec l'anti-GFP de lapin (Millipore cat. AB3080, Etobicoke, ON, Canada or GeneTex cat. GTX30266, Atlanta, GA, USA) dilué 1:500. Ils sont lavés 3 fois avec du PBS 0.1M (5 min chaque) et incubés à la température pièce avec l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à l'Alexa Fluor 488 (1:500) (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada). Les lames sont lavées encore 3 fois et laissées à sécher sous une hotte. Les lames sont couvertes avec la solution de montage Aqua Polymount (Polysciences Inc., cat. 18 606, Warrington, PA, USA).

Les images obtenues à l'aide d'un microscope à épifluorescence DM4000B ont servi à l'analyse par comptage de cellules infectées avec le logiciel "open-access" ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

## RÉSULTATS

### SOURIS DE TRANSGENÈSE

#### Détection du génotype Cre par RT-qPCR

À la suite de la réalisation de multiples réactions de polymérase en chaîne quantitative en temps réel, nous avons pu confirmer que le nombre de copies du transgène codant pour la Cre recombinase, lorsque présente dans nos souris *AvCre<sup>ERT2</sup>:STOP-FlagDOP*, semble être constant. Cette analyse demeure théorique puisque nous ne possédons pas de contrôle positif externe avec un nombre de copies prédéterminé afin de procéder à une étude quantitative absolue ou même relative ( $\Delta\Delta Ct$ ). Cependant, la superposition des courbes d'amplification observé suggère que le nombre de copies est stable, si l'on compare avec un des premiers

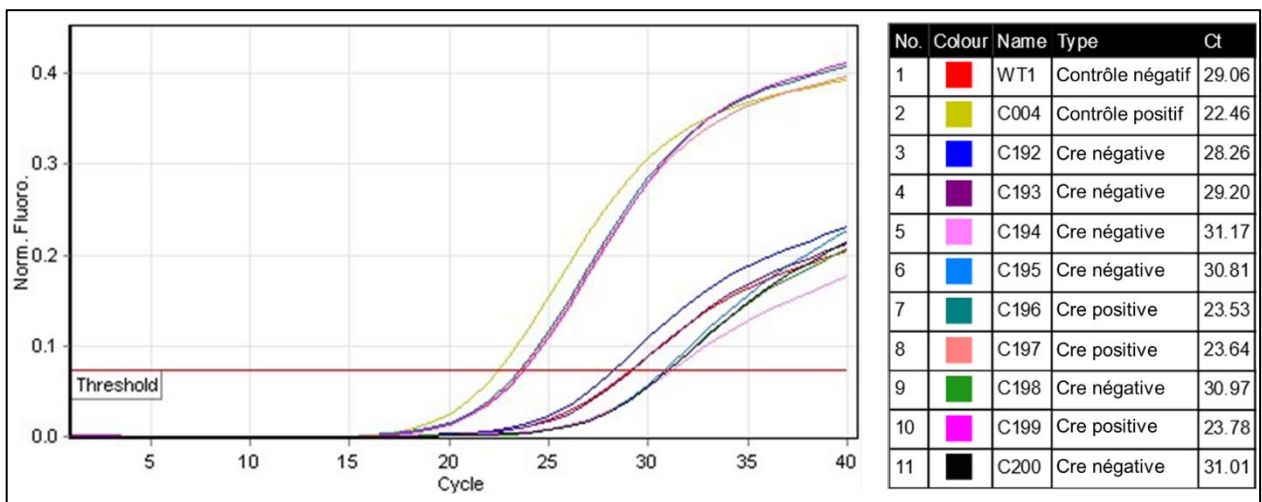


Figure 5: Graphique représentant les copies du transgène codant pour la Cre obtenue par RT-qPCR

parents. Même après de nombreuses générations les courbes sont très similaires (Figure 5) à celles observées pour le contrôle positif (premier parent). Dans cette figure, nous avons fixé le seuil de fluorescence normalisée à 0,07244, ce qui correspond à la portion linéaire de la pente suivant l'apparition de la fluorescence. Alors, en comparant le Ct (Cycle Seuil) obtenu avec leur contrôle respectif, nous pouvons remarquer que ces Cre positives se retrouvent dans un écart de 1,32 cycle avec le contrôle positif (C004). Cependant, les Cre négatives possèdent un écart jusqu'à 2,11 cycles avec le contrôle négatif (WT1). Comme, le transgène

contrôle est considéré comme ayant un nombre de copies stable, ceci suggère que l'écart constaté pour les Cre positives indique que le nombre de copies du transgène codant pour la Cre recombinase est aussi stable. De plus, les copies du transgène codant pour la Cre recombinase sont transférées à la progéniture dans un pourcentage variant entre 25% et 50%. Toutefois, nous avons observé un pourcentage de transfert de 50% qu'en de rares occasions, ce qui est surprenant étant donné la suggestion faite par Jackson Laboratory qui stipule que les souris devraient suivre un ratio de transfert suivant les ratios mendéliens (1 :2).

## **IMMUNOHISTOCHEMIE**

### Détection du FLAG

Malgré de multiples essais afin de détecter l'épitope FLAG dans les tissus de nos souris knock-in FLAG-DOP KI(c), aucune tentative n'a semblé porter fruit. En premier lieu, nous avons tenté l'utilisation de divers anticorps anti-FLAG commerciaux, en modifiant leurs concentrations. Aucune approche ne semble avoir résolu le problème de détection. Le bruit de fond et/ou le signal non spécifique, selon l'anticorps utilisé, sont trop importants ce qui réduit la perception d'un signal spécifique potentiel. Toutefois, lorsque nous essayons de réduire le signal non-spécifique par dilution de l'anticorps, le signal spécifique en est réduit de manière équivalente. Même à une faible concentration d'anticorps, nous ne pouvons pas réduire complètement le signal non-spécifique et le signal spécifique est alors camouflé ou indistinguable (Figure 6).

Une hypothèse serait que l'épitope est caché par des résidus lipidiques tels que ceux formant la membrane nucléaire et cellulaire. Une seconde hypothèse serait qu'une glycosylation produite par la présence de chondroïtine sulfate mènerait au changement conformationnel de la structure du DOP, le rendant possiblement inaccessible aux anticorps. L'utilisation de collagénase ou de chondroïtinase aurait permis de répondre à la question quant à la participation de ces candidats dans l'incapacité à détecter le FLAG, cependant nous

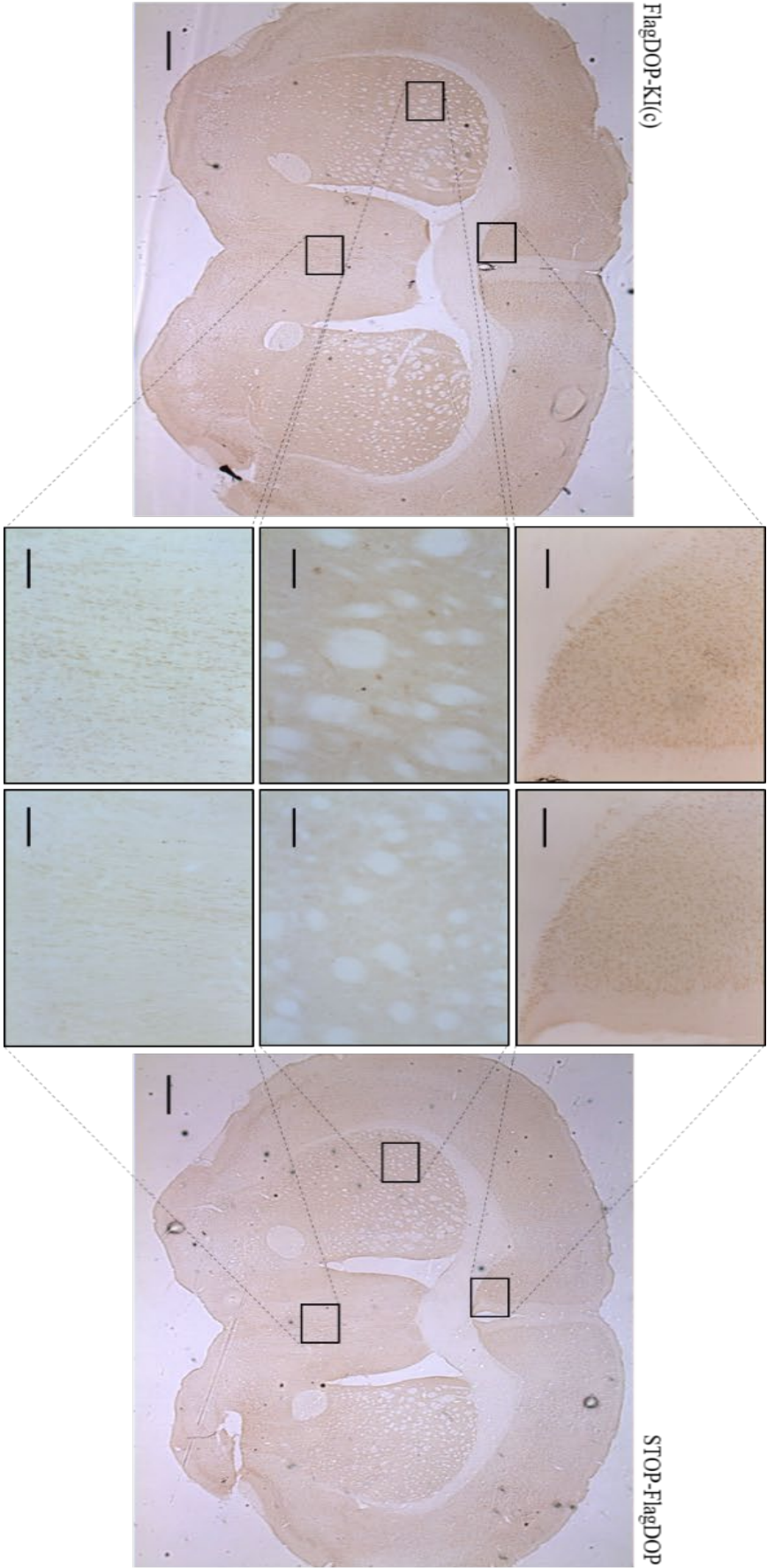


Figure 6: Tentative de détection du FLAG sur souris FlagDOP-KI(c) et STOP-FlagDOP par l'utilisation d'un anti-FLAG de lapin polyclonal. Cette immunohistochimie a été produite via l'utilisation d'anticorps primaires anti-FLAG rabbit polyclonal (1 :500) et un anticorps secondaire anti-lapin biotinylé (1 :1000). La révélation est produite par la combinaison du complexe avidine biotine HRP (ABC) et DAB. Images produites à l'aide du microscope Leica DM-4000 avec objectif 1.25X pour des tranches coronales de cerveau (barre d'échelle : 1 mm) et 20X pour les vues rapprochées (barre d'échelle : 100  $\mu$ m).



avons opté pour la clarification des tissus qui permet d'éliminer ou de réduire significativement la réfraction de la lumière par les lipides. La clarification des tissus repose sur le retrait de tous les lipides par l'utilisation de détergents ou de solvants, tout en conservant les protéines. En clarifiant le tissu, nous permettons donc l'élimination de toutes membranes ainsi que des vésicules permettant un accès avantageux aux récepteurs DOP par les anticorps. Cette approche a permis de tester la première hypothèse.

Malheureusement, les données obtenues sont peu concluantes puisque l'anti-GFAP servant de contrôle positif à l'immunohistochimie n'a émis qu'un bruit de fond. L'anti-GFAP devait marquer les protéines acides fibrillaires gliales présentes dans les cellules gliales, dont les astrocytes. Un signal devrait donc être observé partout dans le cerveau, mais il n'y a aucun signal dans le cortex (Figure 7D), le noyau Septal Médian (Figure 7E) ou le striatum (Figure 7F), ce qui rend l'évaluation du signal obtenu avec l'anti-FLAG peu fiable. Cependant, on peut observer un signal dans le spectre rouge, notamment dans le cortex (Figure 7A) qui pourrait correspondre au signal FLAG-DOP. En revanche, basé sur nos connaissances présentes de la distribution du récepteur DOP dans le cerveau de souris, il devrait y avoir un signal encore plus important dans le striatum (Figure 7C), ce qui n'est pas le cas. Cette divergence de marquage pourrait provenir du fait qu'aucun blocage de souris sur souris (M.O.M. blocking kit) n'a été fait. Il serait alors intéressant de réessayer cette expérience, cette fois en utilisant une étape supplémentaire de blocage d'IgG de souris. Aussi il serait pertinent de reproduire cette expérience sur des tranches de moelle épinière de souris. Pour conclure, le marquage du FLAG détecté par immunofluorescence, ne correspondant pas au signal observé dans nos autoradiographies sur sections ciblant la protéine DOP, suggère que l'immunohistochimie en général n'a pas fonctionné.

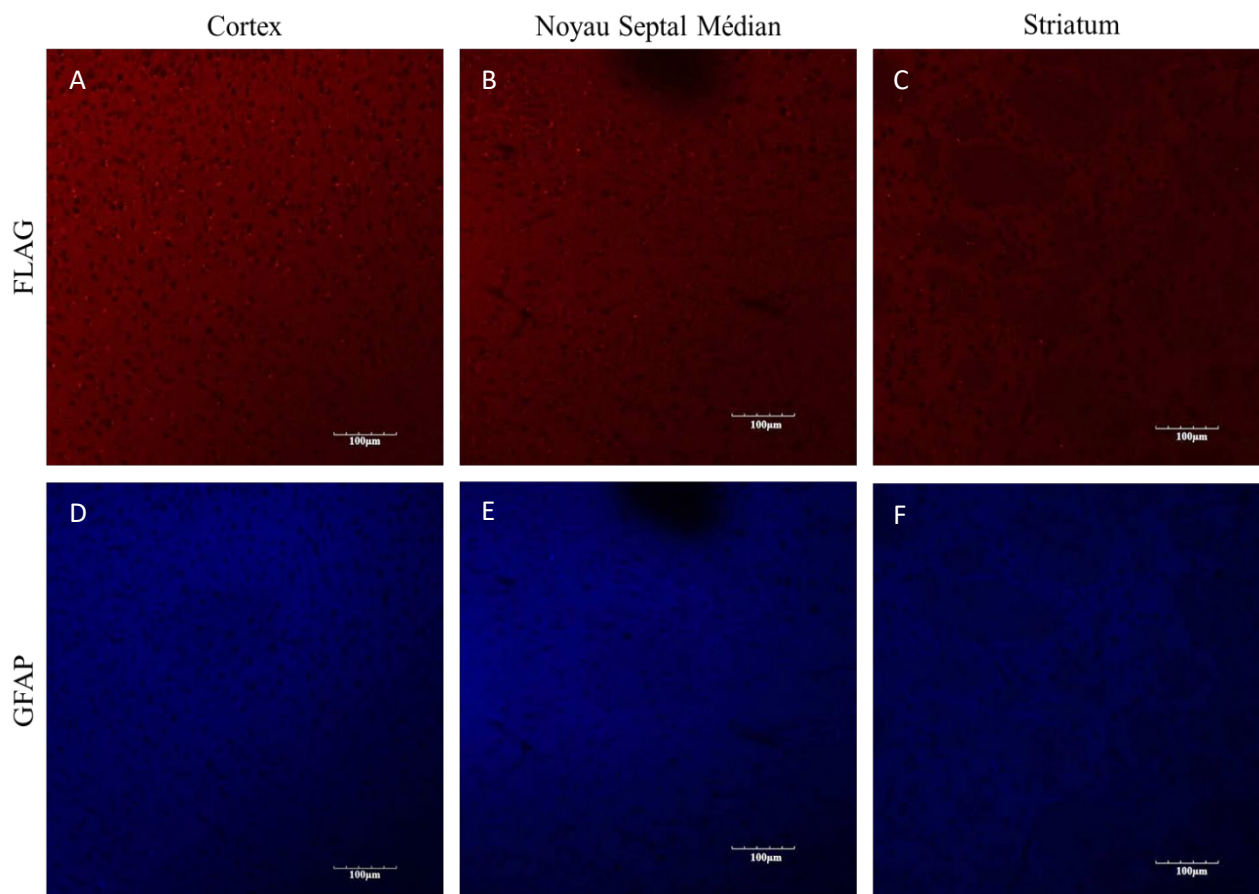


Figure 7: Image confocale d'un essai de révélation du FLAG par clarification de tissus sur souris FlagDOP-KI(c), avec GFAP comme marqueur contrôle pour l'immunohistologie (barre d'échelle : 100µm)

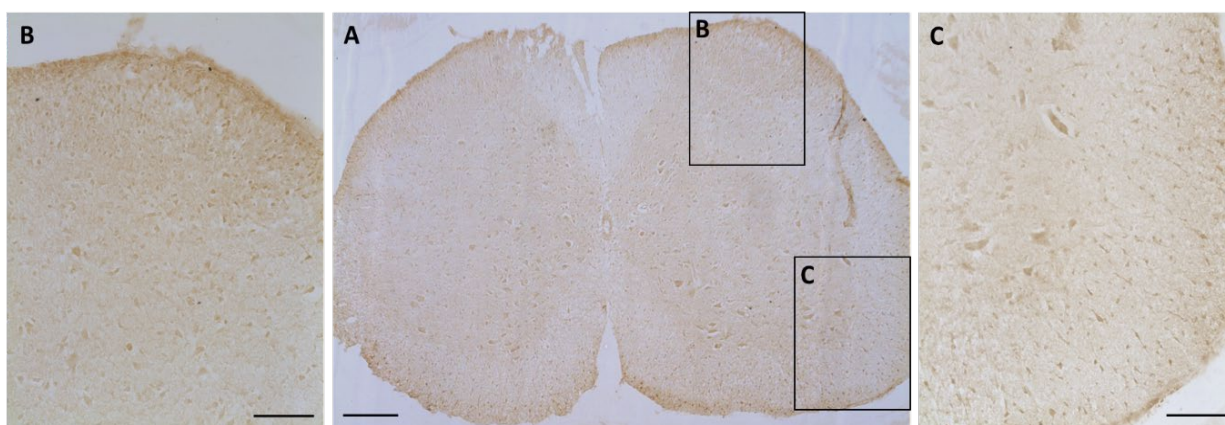


Figure 8: Essai de détection du FLAG après digestion à la sulfatase VIII sur souris FlagDOP-KI(c). A) Vue générale d'une tranche de moelle épinière au niveau lombaire (1.25X), barre d'échelle : 100 µm. B-C) Agrandissement 20X, barre d'échelle : 1 mm.

Considérant que la clarification n'a pas été un succès, une autre piste a été explorée, celle de l'utilisation de sulfatase. Quelques papiers notamment celui de (Hunter et al., 2016) et (Schmidt et al., 2012) indiquaient la possibilité que l'épitope FLAG soit sulfaté au résidu tyrosine, diminuant ainsi sa reconnaissance par les anticorps. Afin d'explorer cette voie, une immunohistochimie a été produite à la suite de l'utilisation de sulfatase. Puisque celle-ci n'a à priori jamais été utilisée sur tissu, les conditions nécessaires afin d'optimiser son activité ont dû être testées. Plusieurs essais ont été faits, en variant la température d'incubation, la solution tampon et ses constituants ainsi que son pH, sans pour autant augmenter le signal obtenu, ce qui nous laisse supposer que les conditions optimales d'activation de la sulfatase n'ont pas encore été trouvées ou que la sulfatase n'est simplement pas la solution au problème de détection. Comme nous pouvons observer sur les images obtenues (Figure 8), le signal proviendrait quasi-uniquement des interneurones, ce qui suggère que le signal est non-spécifique. Cette affirmation est confirmée par la présence de ce même signal dans le contrôle négatif, la souris STOP-FlagDOP (Figure non montrée). Malheureusement, aucune des approches avec la sulfatase, comme de changer la concentration du pH, la concentration de la sulfatase, la température et le temps d'incubation, la présence d'ion ou encore la présence de sérum n'a été la solution à nos problèmes de détection. En effet, aucun signal préférentiel aux couches I et II de la corne dorsale (Figures 8A et 8B), comme montré précédemment en essai autoradiographique sur sections n'a pu être observé. De plus, nous pouvons remarquer un signal d'intensité similaire dans la région ventrale (Figure 8C), qui n'est pas supposé exprimer autant que les cornes dorsales. Cette observation suggère que le signal observé dans cette moelle épinière n'est en fait qu'un signal non spécifique.

## **IMMUNOFLUORESCENCE SUR CELLULES**

### Détection du FLAG

Suivant l'échec à révéler la présence de l'épitope FLAG sur tissu nerveux murin en utilisant la sulfatase, et implicitement la présence du récepteur DOP. Nous nous sommes demandé si une sulfation serait en effet responsable de la difficulté à visualiser un marquage du FLAG à la suite d'utilisation d'un anticorps anti-FLAG. Pour investiguer cette possibilité, nous avons eu recours à des cellules HEK293 FLAG-DOP, qui surexprime le DOP. Trois essais ont été effectués en modifiant le pH de la solution tampon et sa concentration ionique

afin d'optimiser l'activation de la sulfatase. Toutefois, aucune tentative n'a permis de détecter une présence accentuée significative du FLAG. Ceci nous laisse penser qu'une sulfation de l'épitope FLAG n'est pas la cause de la difficulté à visualiser sa présence par l'utilisation d'anticorps dirigés contre celui-ci.

#### AUTORADIOGRAPHIE SUR SECTIONS

##### Détection du récepteur DOP avec ligand radiomarké

L'identification de la localisation d'une protéine peut se faire par l'utilisation de ligands radiomarkés. Pour cette expérience, l'activation de la Cre recombinase n'est pas visible puisque qu'aucune des deux souris ( $AvCre^{(+/-)ERT2}$  et  $AvCre^{(-/-)ERT2}$ ) ne semble exprimer la protéine DOP. En effet, en présence de DOP dans les afférences primaires, il y aurait dû avoir une présence d'un signal aux couches I et II de la corne dorsale. Cependant, ce signal est entièrement absent de la moelle épinière chez nos deux sujets. En effet, nous pouvons constater que les signaux obtenus dans les figures 8A et 8C correspondant aux souris  $AvCre^{(+/-)ERT2}$  et  $AvCre^{(-/-)ERT2}$  ont un signal faible et différent de celui observé au panneau 9E correspondant à la souris FlagDOP-KI(c). De plus, nous pouvons aussi observer que le signal (9A, 9C) est vraiment faible et répandu au travers de la moelle épinière ce qui suggère la présence de bruit de fond. Pour ce qui est des figures 8B, 8D et 8F, toutes illustrent un signal préférentiel du MOP aux couches I et II, comme attendu, chez les souris  $AvCre^{(-/+ )ERT2}$ ,  $AvCre^{(-/-)ERT2}$  et FlagDOP-KI(c). Tel que mentionné, les souris  $AvCre^{(-/+ )ERT2}$  et  $AvCre^{(-/-)ERT2}$  expriment toujours le récepteur MOP. De plus, on peut observer sur la figure 9E un signal aux couches I et II, confirmant l'expression du récepteur DOP dans la moelle épinière. Ces résultats sont cependant basés sur une seule expérience et ceci est dû au nombre insuffisant de souris  $AvCre^{ERT2}$  disponibles. Toutefois, deux explications pourraient expliquer ces observations, soit une exposition trop courte étant donné qu'une grande proportion des récepteurs DOP au niveau spinal ne sont plus exprimés ou la Cre recombinase n'a pas été activée à la suite des injections du Tamoxifène intrapéritonéal. Étant donné que les injections intrapéritonéales sont une procédure de routine, les risques associés à son échec sont vraiment faibles.

[<sup>125</sup>I]deltorphine I

[<sup>125</sup>I]DAMGO

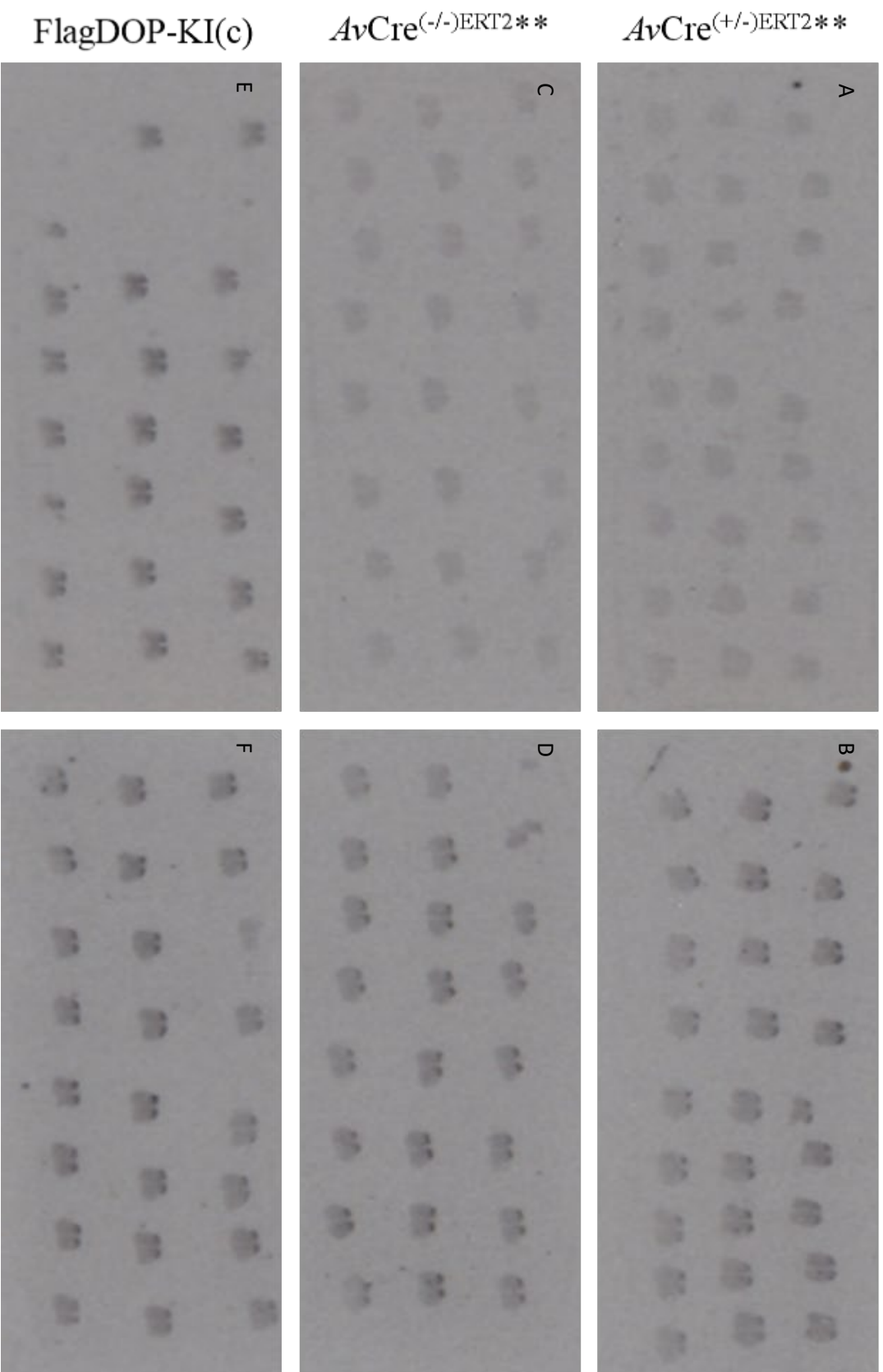


Figure 9: Autoradiographie sur sections avec ligand [<sup>125</sup>I]-Deltorphine I \*\* Les souris utilisées (*AvCre*<sup>(+/-)</sup>ERT2 et *AvCre*<sup>(-/-)</sup>ERT2) ont perdu leurs tags d'identification avant que leurs tissus ne soient collectés et ainsi l'affichage utilisé pour ces dernières est aléatoire et seulement à but représentatif.

Considérant cette notion, l'explication la plus valide est le manque de temps d'exposition et la très faible expression de DOP au niveau présynaptique, dans la moelle épinière chez les souris  $AvCre^{(-/+)}ERT2$  et  $AvCre^{(-/-)}ERT2$ .

## FLUORESCENCE SUR TISSUS

### Souris $ROSA^{nT/nG}$

Afin de caractériser le modèle d'expression de la Cre recombinase dans nos souris  $AvCre^{ERT2}$  ainsi que de confirmer son activité à la suite d'injections répétées de Tamoxifène, la souris  $AvCre^{ERT2}$  a subi un croisement avec une souris "de traçage génétique"  $ROSA^{nT/nG}$ . Tel que mentionné précédemment, cette dernière possède deux protéines fluorescentes nommées TdTomato (émet un signal rouge) et eGFP (émet un signal vert). Le TdTomato est suivi d'une cassette d'arrêt d'expression et est aussi encadré par deux sites homologues loxP qui permet le retrait du TdTomato et de la cassette d'arrêt d'expression par l'utilisation d'enzyme Cre recombinase. Le retrait de la TdTomato et de la cassette permet ainsi l'expression de la eGFP. Cette analyse a permis de confirmer que l'expression de la Cre recombinase est bien limitée aux afférences primaires. Une quasi-totalité des cellules des DRGs semblent exprimer l'activité de la Cre recombinase avec un taux d'expression moyen de 89 %. Le signal, dans la moelle épinière, semble se limiter à la corne dorsale en faible concentration et peu de signaux sont observés au niveau cérébral. Seules les souris injectées préalablement au Tamoxifène produisent une recombinaison génomique, et ce pour l'ensemble du système nerveux. En effet, la majorité des noyaux des cellules de DRG émet un signal fluorescent vert propre au signal émis par la eGFP, tandis que les noyaux appartenant aux cellules satellites produisent l'émission de fluorophores rouges provenant de la protéine tdTomato (Figure 10).

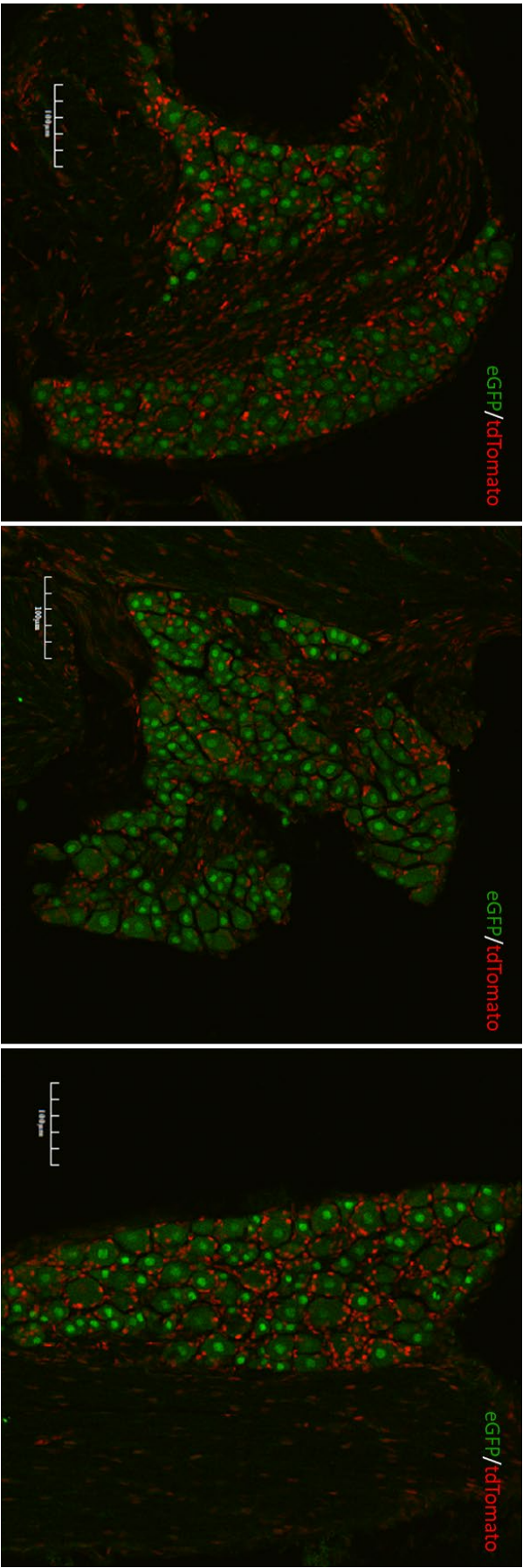


Figure 10: Présence de recombinaison par la Cre recombinase dans les noyaux des cellules de DRG permettant l'expression de la eGFP (en vert) au lieu de la tdTomato (en rouge).



## TESTS DE COMPORTEMENT SUR SOURIS

### Hargreaves

Maintenant que nous avons vérifié l'activité de la Cre Recombinase dans les cellules des afférences primaires, Il est important d'établir que le nouveau modèle de souris  $AvCre^{ERT2}:STOP\text{-}FlagDOP$  perçoit des niveaux similaires ou du moins significatifs d'analgésie en présence de deltorphine II (agoniste delta) en situation de douleur inflammatoire tel que désigné dans la section *Objectifs* mentionnée dans l'introduction. En rappel, l'objectif 1 consiste à déterminer s'il y a présence d'analgésie suivant une injection intrathécale de deltorphine II chez une souris "humanisée" à la suite d'une stimulation thermique en situation de douleur d'origine inflammatoire. Pour y arriver, le test de

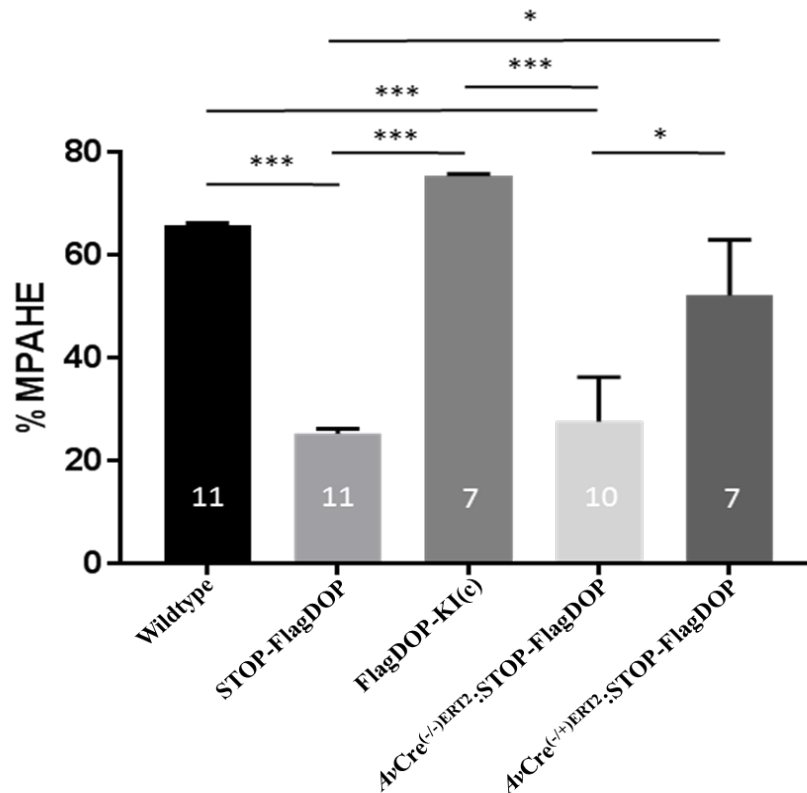


Figure 11: Graphique comparatif des seuils moyens de douleur d'origine thermique en situation inflammatoire chez nos différentes souris de transgénèse obtenus au moyen du test de Hargreaves. Les souris possédant l'allèle responsable de l'expression de la Cre recombinase ( $AvCre^{(-/+)}ERT2$ ) démontrent un seuil d'analgésie intermédiaire, à la suite d'injection de deltorphine II, à ceux observés chez les souris wildtype ou les souris FlagDOP-KI(c). En revanche, la deltorphine II ne réussit pas à provoquer une analgésie significative chez les souris ne possédant pas l'allèle ( $AvCre^{(-/-)}ERT2$ ) ainsi que les souris STOP-FlagDOP. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



Hargreaves a été utilisé afin de déterminer le temps de retrait de la patte inflammée à la suite de l'exposition à un faisceau lumineux thermique. Les données ont été recueillies sur un intervalle de 15 min pendant 1 heure et comparées avec la valeur de base (baseline) obtenue au préalable. Les données ont été reportées en pourcentage d'effet antihyperalgésique maximal possible (%MPAHE, % of the maximum possible antihyperalgesic effect). Le %MPAHE repose sur le quotient entre la différence de la valeur maximale (d'hyperalgésie

$$\%MPAHE = \frac{\text{Valeur maximal post-injection delt. II} - \text{Baseline Post-CFA}}{\text{Baseline Pre-CFA} - \text{Baseline Post-CFA}} * 100$$

observée) post-injection de deltorphine II et de la valeur de base post-CFA sur la différence entre la valeur baseline pré-CFA et la valeur baseline post-CFA, le tout multiplié par 100, afin d'exprimer la valeur en pourcentage.

Les valeurs ont ensuite été analysées statistiquement avec une analyse de variance à deux facteurs (two way ANOVA) suivis du post hoc test de Tukey. Les données portant sur les souris wildtypes, STOP-FlagDOP et FlagDOP-KI(c) ont été produites par Khaled Abdallah, ancien étudiant du laboratoire.

La souris *AvCre<sup>(-/-)</sup>ERT2*:STOP-FlagDOP (27.6%) présente une différence significative avec la souris wildtype, FlagDOP-KI(c) et *AvCre<sup>(+/-)</sup>ERT2*:STOP-FlagDOP (respectivement 65.9%, 75.4%, 52.2% ;  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ ), mais pas significative avec la souris STOP-FlagDOP (25.3%). La souris *AvCre<sup>(+/-)</sup>ERT2*:STOP-FlagDOP (52.2%) présente quant à elle une différence significative avec la *AvCre<sup>(-/-)</sup>ERT2*:STOP-FlagDOP et la STOP-FlagDOP (respectivement 27.6%, 25.3% ;  $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$ ), mais la différence n'est pas significative en comparatif aux valeurs obtenues pour la wildtype et la FlagDOP-KI(c) (Figure 11).

## SOURIS INJECTÉES AVEC VIRUS ADÉNOASSOCIÉ

Afin d'augmenter la taille des échantillons pour une publication en attente d'approbation, il m'a été offert de participer à la réalisation d'expériences immunohistologiques pour ce papier, maintenant publié sous *Abdallah, K., Nadeau, F., Bergeron, F., Blouin, S., Blais, V., Bradbury, K.M., Lavoie, C.L., Parent, J.-L., and Gendron, L. (2018). Adeno-associated virus 2/9 delivery of Cre recombinase in mouse primary afferents. Sci. Rep. 8, 7321.* Ce papier explore les différentes voies d'injection et leur efficacité à induire la recombinaison de l'ADN préférentiellement dans les fibres afférentes composant les DRG. La voie intraveineuse est exclue puisque le rAAV a le pouvoir de traverser la barrière hématoencéphalique infectant non seulement les fibres des DRG, mais aussi toutes celles composant le système nerveux central et périphérique. Les voies d'injections étudiées pour ce papier sont donc intraplantaire et intrathécale.

Suivant la collecte des tissus murins, nous avons procédé à l'observation des tissus au moyen de microscopie à épifluorescence Leica DM 4000II. Les images obtenues ont permis d'établir le taux d'infection moyen et ainsi comparer les différentes voies d'injection. Au premier coup d'œil, nous pouvons apercevoir un niveau d'expression supérieur lorsque l'injection intraplantaire est effectuée à 5 jours postnataux vs 25 jours postnataux (Figure 12). En effet, lorsqu'on compare le taux d'infection obtenu par le décompte des cellules infectées par rapport au nombre total de cellules, nous pouvons établir que l'injection intraplantaire à 5 jours postnataux est plus de deux fois supérieure (20 %) que celle produite à 25 jours postnataux (9,20 %). Maintenant, lorsque nous comparons la meilleure approche d'injection intraplantaire (5 jours postnataux) avec l'injection intrathécale, le taux d'infection est encore largement doublé (51,60 %), voire pratiquement triplé (Figure 13).

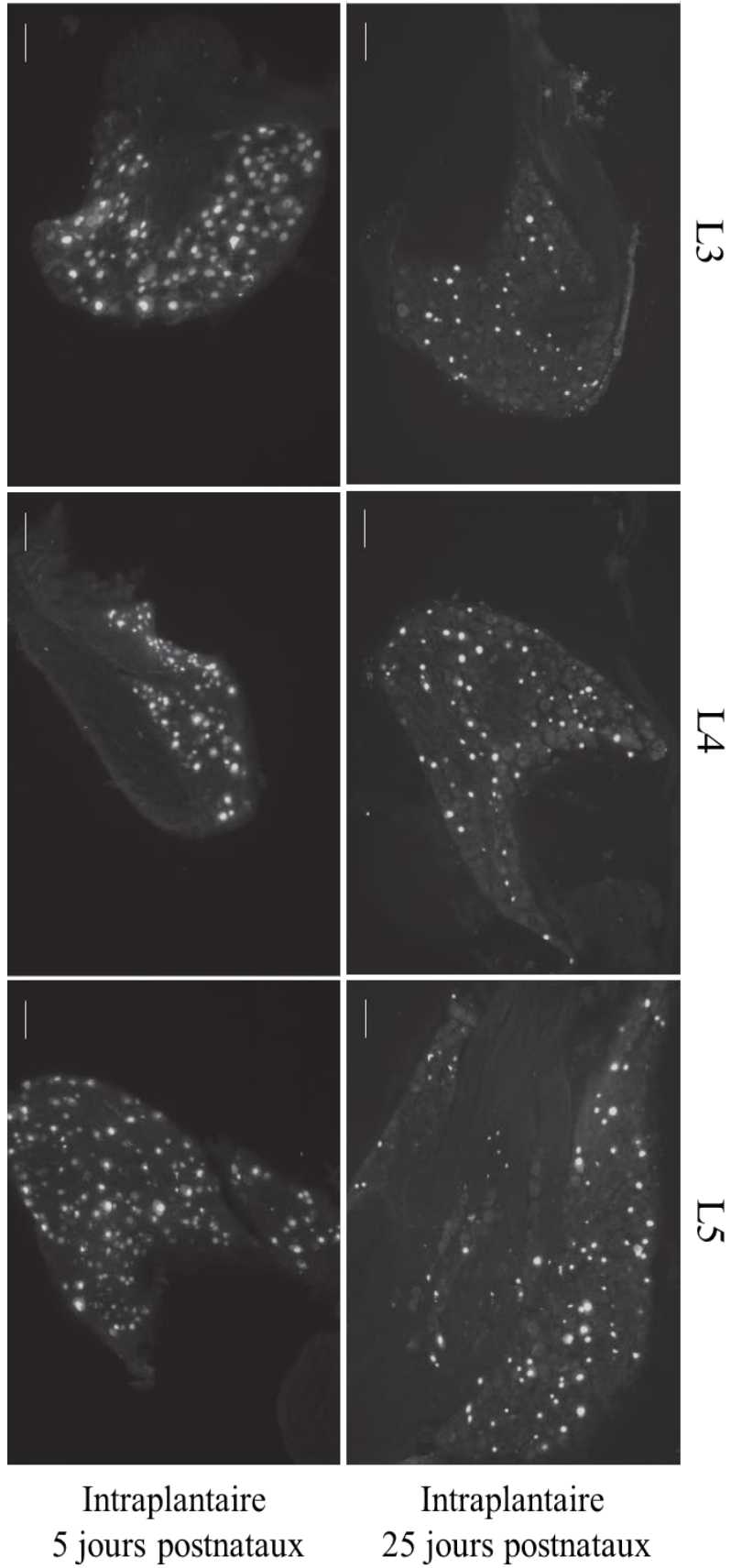


Figure 12: Photographie représentant le niveau d'expression de la eGFP sur des tranches de DRG provenant de différents niveaux lombaires en comparaison avec deux voies d'injection du virus *rAAV2/9-CBA-Cre<sup>GFP</sup>* chez la souris STOP-FlagDOP. Barre d'échelle : 100  $\mu$ m

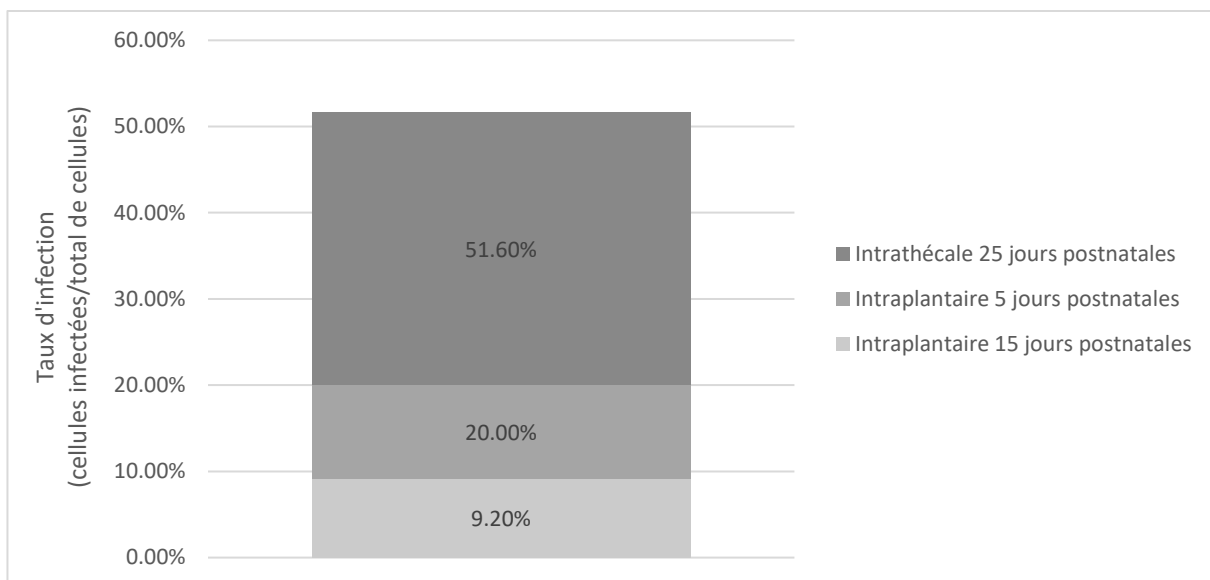


Figure 13: Représentation graphique des taux d'infection moyens obtenus par les différentes voies d'injection.

## DISCUSSION

Les études du récepteur opioïde delta sur les rongeurs ont suscité un intérêt grandissant pour le traitement de la douleur chronique, cependant peu d'entre elles peuvent étendre leurs conclusions à l'humain considérant la divergence d'expression du DOP dans le système nerveux du rongeur et de l'humain (Mennicken et al., 2003). L'intérêt suscité pour ce récepteur repose sur ses capacités à produire une analgésie lors de douleur chronique aussi prononcée que la morphine et ses dérivés (Fraser et al., 2000), sans pour autant induire la plupart des effets secondaires observés chez ces derniers (Dondio et al., 2001; Gallantine & Meert, 2005). De plus, les effets bénéfiques associés ne se limiteraient pas seulement à l'analgésie, mais l'activité du DOP fournirait aussi des effets anxiolytiques et antidépresseurs (Filliol et al., 2000) qui veilleraient à réguler la composante émotionnelle de la douleur autant que la composante physique. Cependant, la plupart des essais cliniques de phase II testant les agonistes DOP (ADL5859 et ADL5747 dépourvus d'effets convulsifs) échouent à inhiber de façon significative la douleur chez l'humain (Spahn & Stein, 2017).

Cette divergence entre les observations expérimentales et cliniques nous a poussé à développer une nouvelle approche pour mieux comprendre les différences liées à la distribution du récepteur DOP entre les espèces. Puisque chez l'humain, du moins au niveau spinal, la divergence dans la localisation du récepteur entre les rongeurs et l'humain est significative, il faut pouvoir distinguer le rôle des récepteurs exprimés dans les régions communes soit, les afférences primaires. Si nous nous référons à l'article de Mennicken et al. (2003), nous pouvons observer que l'expression du DOP dans la moelle épinière de l'humain semble limitée aux DRGs et aux couches superficielles I-II. De plus, la moelle épinière est exempte de l'ARNm de DOP. Ces observations suggèrent que le récepteur n'est pas fabriqué par les neurones de la moelle épinière, mais en effet seraient plutôt présent aux niveaux des terminaisons centrales des afférences primaires. De plus, ces observations révèlent un rôle important du DOP dans la voie ascendante de la douleur, puisqu'il serait absent chez les neurones spinaux ventraux chez l'humain, mais pas chez les rongeurs, ce qui suggère une spécialisation du récepteur DOP au cours de l'évolution. Donc, pour arriver à étudier l'impact de ces différences d'expression, nous avons supprimé l'expression du récepteur dans toute la souris à l'aide d'une cassette d'arrêt devant le gène codant pour DOP,

*Oprd1*. Cette cassette flanquée entre deux sites loxP, nous permet ensuite de réexprimer préférentiellement le récepteur dans les endroits désirés, soit les afférences primaires. La réexpression du récepteur dans ces endroits a été dirigée à l'aide d'un promoteur *advillin* contrôlant l'expression de la Cre recombinase. Cette méthode a été rendue possible par un croisement de nos souris STOP-FlagDOP avec la souris *AvCre<sup>ERT2</sup>*. Cette souris offre un caractère d'inductibilité de la Cre recombinase en conservant l'enzyme dans le cytoplasme jusqu'à l'exposition avec le Tamoxifène qui se lie avec un récepteur à l'œstrogène modifié (ERT2) qui ne possède aucune affinité pour l'œstrogène endogène. Un croisement des souris *AvCre<sup>ERT2</sup>* avec une souris "de traçage génétique" *ROSA<sup>nT/nG</sup>*, nous a suffi à confirmer le patron d'expression de la Cre recombinase. En effet, les cellules des DRGs observées démontraient un taux de recombinaison total moyen de 89 %, ce résultat est fidèle à la littérature (Lau et al., 2011). De plus, lorsque nous avons procédé aux études de plusieurs tranches de souris contrôle (*AvCre<sup>(-/-)ERT2</sup>*, non-injectée au Tamoxifène), absolument aucune activité de recombinaison ne pouvait être détectée, cela diffère de ce que l'équipe de Lau rapporte, qui est de moins de 1% (Lau et al., 2011). En revanche, malgré notre prévision d'une absence complète de signal, nous avons constaté un faible taux de recombinaison (quelques cellules uniquement) dans des tranches de cerveau de souris Cre + injectée au Tamoxifène. Les différences avec la littérature sont néanmoins négligeables considérant que la variation n'est que dans l'ordre de quelques neurones. Quant au patron d'expression de l'enzyme au niveau spinal, une très faible population de neurones, tous au niveau de la corne dorsale, semblent l'exprimer. Au niveau cérébral, seuls quelques neurones pour l'ensemble du cerveau montrent une activité de la Cre recombinase.

L'étude des rôles attribués au récepteur DOP en ce qui concerne sa différence d'expression dans le système nerveux chez diverses espèces n'est pas le seul intérêt dans ce projet. Une controverse existe sur la responsabilité des récepteurs MOP et DOP à inhiber certains types de douleur. En fait, certains groupes de recherche suggèrent une spécialisation dans les fibres nociceptives à inhiber un seul type de douleur au niveau des afférences primaires (Abrahamsen et al., 2008 ; Cavanaugh et al., 2009 ; Scherrer et al., 2009). Cette spécialisation serait potentiellement attribuée à la différente localisation du MOP et du DOP dans ces fibres. En conséquence, le MOP serait plus efficace à soulager la douleur d'origine thermique et le DOP à soulager la douleur d'origine mécanique (Scherrer et al., 2009). En

revanche, plusieurs équipes de recherche observent la capacité de chacun de ces récepteurs à réduire l'hyperalgésie, ou l'allodynie, d'origine mécanique et thermique (Kondo et al., 2005 ; Normandin et al., 2013 ; van Rijn et al., 2012).

L'étude comportementale du rôle de ces récepteurs afin de distinguer leurs rôles physiologiques respectifs en douleur, et ce dans les afférences primaires est primordiale. Nos souris *AvCre<sup>ERT2</sup>:STOP-FlagDOP* exprimant le DOP préférentiellement dans les afférences primaires (Lau et al., 2011) permettrait de répondre à une partie de ce problème tout en examinant la capacité de ce récepteur à inhiber la douleur en situation inflammatoire et neuropathique. Nos données préliminaires, sur les souris *AvCre<sup>(-/+)</sup>ERT2* suggèrent que le DOP serait en effet capable d'inhiber la douleur d'origine thermique, ce qui viendrait supporter l'hypothèse que la dissociation de la douleur se produirait au niveau supraspinal (Perl, 2007). Toutefois, la présence unique du récepteur DOP dans les afférences primaires ne provoquerait pas le soulagement à une amplitude similaire à la souris wildtype ou bien *FlagDOP-KI(c)*, mais légèrement moindre. Au cours de la réalisation de l'objectif 1, qui visait à évaluer au moyen du test de Hargreaves, la capacité du DOP dans les afférences primaires à soulager l'hyperalgésie à la suite d'une injection de deltorphine II en situation inflammatoire, nous avons eu de la difficulté à générer suffisamment de souris *AvCre<sup>ERT2</sup>:STOP-FlagDOP* puisque les souris en reproduction mouraient de façon subite et prématurée (environ à 4 mois postnatales). Nous pensons que ces morts seraient attribuables à une expression génétique délétère apparue suite à l'intégration aléatoire de transgène *AdvillinCre<sup>ERT2</sup>* dans la souris C57BL/6.

Afin de prévenir la perte complète de cette lignée, toutes nouvelles souris générées ont été dirigées vers la reproduction pour le maintien de la colonie. Puisque premièrement le taux de transmission du gène *AvCre<sup>ERT2</sup>* étant déjà faible (environ 1:4) et que deuxièmement seules les souris *AvCre<sup>ERT2</sup>:STOP-FlagDOP* peuvent être utilisées aux fins de ce projet, les souris générées ont été à peine suffisantes pour le maintien la colonie, ne laissant aucune possibilité de poursuivre les objectifs 2, 3 et 4 dans le cours de ma maîtrise. Les laboratoires Jackson ont émis un communiqué nous informant de ce problème. La colonie est actuellement en cours de transfert dans un background génétique différent.

Pendant ce temps, j'ai pu me familiariser avec la méthode de Von Frey afin de maximiser le succès de la méthode et de minimiser les erreurs techniques qui pourraient compromettre l'utilisation des données aux fins statistiques. Toutefois, à l'automne 2018, nous avons été informés que le transgène codant pour l'*AvCre*<sup>ERT2</sup> a été intégré dans un site génomique de la souris provoquant un effet délétère chez la souris C57BL/6. Cette situation est causée par l'intégration aléatoire du transgène via injection pronucléaire de l'ADN purifié codant *AvCre*<sup>ERT2</sup> dans un ovule fertilisé de souris. L'ovule est ensuite réintégré dans la souris femelle et porté à terme. Le transgène étant en contact avec l'intégralité du génome peut ainsi s'intégrer à un endroit aléatoire. Il faut noter qu'à partir de ce stade, le transgène intégré reste au même endroit, et ce même pour la progéniture héritant de l'allèle possédant le transgène. Si le transgène est intégré dans une région codante, il peut s'engendrer un effet délétère lorsque l'insertion empêche l'expression d'une protéine essentielle à la survie de l'organisme. De plus, si au contraire le gène est intégré dans une région non codante, il pourrait tout de même influencer la survie de l'organisme en modifiant les promoteurs, les répresseurs et les activateurs de l'ADN. Pour remédier à la situation, la solution est de transférer le transgène dans une autre lignée de souris que la C57BL/6, afin de possiblement annuler les effets délétères. En effet, les différentes lignées de souris possèdent des différences observables quant à leur ADN. Ce changement dans l'ADN pourrait être suffisant à abolir les interactions délétères que produirait la présence du transgène. Le transfert complet du transgène et la stabilité de la lignée sont espérés après six générations ce qui ne sera pas réalisable dans l'intervalle de temps alloué à la réalisation de ce projet. Alors les objectifs 2, 3 et 4 n'ont pas été entamés et ne seront pas complétés à l'aboutissement de ma maîtrise.

Les pratiques pour le test de Von Frey se sont révélées, toutefois, intéressantes. Comparé au test de Hargreaves, le test de Von Frey ne s'est pas montré aussi simple. Plusieurs détails rendant le test plus compliqué ont été mis en lumière. Premièrement, les souris à la suite de l'injection au CFA développent une patte tellement enflée que le filament de Von Frey glisse souvent au contact de la patte. Normalement dans une patte non-inflammée le contact avec le filament produirait une légère indentation dans le tissu facilitant l'immobilisation de celui-ci. Cependant, pour la patte inflammée la pression interne de la patte réduit cette indentation rendant le filament moins stable. Ce mouvement peut créer un



chatouillement ou une éraflure pouvant mener à une hypersensibilisation, si répété. De plus, ce glissement du filament pourrait produire un biais dans la mesure en causant un comportement *nocifensif* (Réponse de protection contre la douleur) étant interprété comme un résultat positif à un stimulus inférieur au seuil de retrait de la patte (PWT, Paw withdrawal threshold) et camoufler une possible anti-hyperalgésie. L'expérimentateur doit donc s'avérer très stable et bien situer le poil de Von Frey sous la patte de manière à éviter la région près des coussins supérieurs, où il y aurait présence d'œdème beaucoup plus important, mais aussi rester dans la zone de test au centre du membre inférieur.

Pour le test de Von Frey, l'immobilité du sujet est de mise puisque le filament doit garder contact pendant plusieurs secondes et qu'il y a la présence d'un obstacle latéral (la grille). Malheureusement, la souris semble développer une hypersensibilité au contact prolongé et répété à la grille, la rendant plus sujette au mouvement. Éventuellement, la souris s'immobilise, mais retire une de ses pattes de la grille, rendant ainsi les mesures impossibles. Si la patte d'intérêt n'est pas déposée, le filament ne fera que pousser contre la patte rendant la force appliquée inexacte. Toutefois, si la patte d'intérêt est déposée, mais qu'une des autres ne l'est pas, la pression de la surface maintenant exercée sur le pied a le potentiel de créer une inhibition locale selon la théorie du portillon en activant les fibres non-nociceptives A $\beta$ . Ces deux situations ont la capacité d'interférer avec nos observations les rendant non-reproductibles. Afin de réduire l'hypersensibilité, les souris doivent s'habituer à la grille pendant au moins une heure (jusqu'à 2 heures) pendant 5 jours. À ce moment, il a été observé que ces souris n'exprimaient plus d'hypersensibilité et toléraient mieux la grille rendant la prise de mesures possibles. Pitcher et al. (1999) suggère cependant que la surface en plus de créer de l'hypersensibilité serait la cause d'irrégularité dans la prise de données en évitant la distribution égale du poids de l'animal sur ses quatre pattes. Le groupe offre comme solution de créer une plateforme en plexiglas opaque avec plusieurs trous de petit diamètre offrant une surface équivalente que la grille, mais optimiserait le support de l'animal.

Le stress induit par la manipulation de la souris est aussi un facteur menant à la complexité de la technique. La contention de la souris afin de procéder à l'injection du composé analgésique est un facteur de stress remarquable qui ne peut pourtant pas être évité et qui cause une excitation de la souris suivant sa réinsertion dans sa boîte expérimentale.

Les 15 minutes laissées à la souris entre l'injection et la première prise de données ne sont malheureusement pas suffisantes pour calmer les souris. L'intégration d'une méthode de contention de deux minutes chaque jour d'habituation permet de réduire le stress de façon à rendre les souris un peu moins actives post-injection. Malgré tout, les souris demeurent tout de même assez actives pour rendre la prise de mesure difficile.

Le comportement de la souris n'est pas le seul obstacle à la collecte de données, l'expérimentateur doit aussi maîtriser la technique d'application du filament de Von Frey. Le filament doit être appliqué perpendiculairement à la patte avec une légère courbe. Cette courbe est censée réduire la variation de force appliquée au moyen de la mise en pratique de la loi de Euler sur la courbature des colonnes (Euler's buckling law, 1744) (Fruhstorfer et al., 2001 ; de Sousa et al., 2014). En théorie, la force exercée par le contact avec la patte augmenterait jusqu'à ce que le filament courbe, à ce point la force resterait la même peu importe le changement de force verticale. Cependant, lors de la vérification du calibrage des filaments de Von Frey utilisés, la balance de calibration n'arrivait pas à se stabiliser et ce même à la suite de la courbure du fil. L'amplitude de la variabilité observée correspondait à  $\pm 10\%$ . Ce qui indique que la théorie est invalide en pratique ou que le changement est causé par le glissement sur la surface de la balance ou encore que l'ensemble de filaments utilisé ne soit plus adéquat. Ce dernier peut être causé par un changement dans l'intégrité du fil, par exemple l'usure constante pourrait avoir mené à une variabilité dans le diamètre tout au long du filament. Un changement des filaments utilisés avec un ensemble plus récent ou voir neuf suffirait à valider l'exactitude de cette hypothèse.

Le temps d'application du filament devrait aussi être gardé au maximum 3 secondes, car plus de temps est long, plus le seuil mesuré est bas (Barrot, 2012). Ce qui pourrait venir réduire la variation entre le seuil pré-traitement et le post-traitement. Le CFA est censé induire l'allodynie ce qui n'était pas observable puisque les valeurs de seuil étaient déjà si basses à 5 secondes. De plus, réduire le temps d'appui des filaments nous permet de gagner un peu de temps ce qui nous procure un avantage étant donné que la technique de Von Frey manuel prend beaucoup de temps (Martinov et al., 2013). Le Von Frey automatique s'est révélé une alternative qui permet de récupérer un peu plus de temps, cependant l'outil est bruyant et induit du stress aux souris. Les souris peuvent même développer une nervosité au

son et retirer la patte de manière précoce à la perception de celui-ci. Donc la méthode manuelle demeure l'étalon d'or dans les mesures d'allodynie mécanique. Le temps nécessaire à la réalisation du test de Von Frey n'est pas seulement long considérant la prise de mesure, mais le temps d'habituation requis pour son exécution chez la souris est non-négligeable. En comparaison, le rat n'a besoin que de 15 min d'acclimatation ce qui ne se compare pas à la souris qui elle a besoin d'un minimum d'une heure précédant la réalisation du test (Bonin et al., 2014).

L'analyse immunohistochimique des tissus de souris STOP-FlagDOP et FlagDOP-KI(c) s'est avérée aussi très intéressante, malgré le manque de développement positif menant à la détection de l'épitope FLAG. Plusieurs hypothèses ont été explorées et rejetées, dont celle de l'utilisation de la sulfatase pour contrer la sulfation possible du résidu tyrosine dans l'épitope pouvant ainsi interférer avec sa reconnaissance par l'anticorps (Schmidt et al., 2012). Tout d'abord, la visualisation de l'épitope FLAG *in vivo* est possible puisque quelques groupes en ont réalisé l'exploit (Ferrando et al., 2015 ; Ikeda et al., 2017). Cependant, cette visualisation concerne des tissus murins intestinaux et la détection semble être plus complexe lorsqu'il s'agit de tissus neuronaux. Le signal associé à l'utilisation d'un anticorps primaire anti-FLAG dans les tissus neuronaux est accompagné d'un niveau important de signal non spécifique. Une tentative de réduction du signal non spécifique en diluant l'anticorps produit aussi une diminution du signal. Toutefois, certains ont aussi réussi à produire un signal raisonnable tout en minimisant le bruit de fond, et ce dans des tissus neuronaux (Lobbestael et al., 2010; Shevtsova et al., 2006). Ces groupes y sont parvenus par l'utilisation des anticorps anti-FLAG monoclonal M2 (F3165) et polyclonal (sigma, F7425). Ils ont cependant eux recours à des injections de vecteurs lentiviraux ou bien de vecteurs recombinants codant pour un eGFP-Flag, ce qui implique une présence plus importante du Flag dans ces tissus que ceux de notre laboratoire. Lobbestael et son équipe ont utilisés les tag FLAG et 3FLAG (Flag exprimé trois fois). Ils ont pu observer l'efficacité des anticorps anti-Flag en comparant le signal obtenue par immunohistochimie avec le signal fluorescent obtenue par le eGFP. Les deux épitopes, le FLAG et le 3FLAG, ont rapportés une efficacité similaire. Shevtsova et son équipe ont utilisé uniquement le FLAG et on aussi rapporté une fidélité entre le signal obtenu par IHC (anti-Flag) et le signal fluorescent. Cependant, en utilisant ces anticorps nous ne sommes malheureusement pas parvenus à produire un signal

aussi important ou même détectable et ce problème a aussi été mentionné par l'équipe de Shevtsova. Ils ont observé que les anticorps anti-FLAG marquait modérément le cytoplasme des cellules neuronales. Une plus grande dilution n'a pas augmenté le ratio entre signal spécifique et non-spécifique, puisque même si la dilution permet de réduire le signal non-spécifique, il réduit aussi le signal spécifique. En revanche, nous n'avons pas exactement reproduit le même protocole expérimental que retrouvé dans l'étude de Lobbestael et collaborateurs, ni de Shevtsova. Toutefois, la présence réduite du FLAG dans nos tissus pourrait tout aussi bien expliquer l'absence de détection d'un signal spécifique. Cette équipe entreprend aussi une étape de récupération d'antigène qui pourrait se révéler importante si la fixation au PFA est la cause derrière l'inefficacité de l'anticorps à reconnaître l'épitope. En effet, la fixation au PFA est efficace étant donné sa capacité à produire des liaisons croisées entre les protéines des tissus et ainsi maintenir la morphologie de celui-ci en arrêtant les procédés dégénératifs tissulaires. Les liaisons croisées peuvent parfois camoufler l'antigène d'intérêt et ainsi prévenir sa détection par l'anticorps. Plusieurs méthodes de récupération d'antigène existent, cependant celle utilisée dans l'étude citée est la suivante, le tissu est incubé dans une solution de Tris (20 mM Tris, pH 9.0, 136 mM NaCl) pour 6 heures à 60 °C. Cette étape pourrait se révéler être l'élément manquant et ne serait pas dispendieuse à tester.

Le masquage de l'antigène peut aussi être prévenu par la fixation avec un fixatif à plus faible concentration. L'utilisation d'une solution de PFA est l'étalon d'or en matière de fixation du cerveau, cependant l'exploration de la fixation avec du 2 % ou 3 % PFA pourrait augmenter les sites spécifiques disponibles pour la détection de l'antigène par l'anticorps. D'autres fixatifs à liaison croisée tels que le formaldéhyde et le glutaraldéhyde possèderaient aussi la capacité à fournir une fixation plus appropriée à la détection. De plus, les fixatifs à précipitation comme les alcools (éthanol, méthanol et acétone) produisent une agrégation des protéines en réduisant la solubilité des protéines afin de perturber les interactions hydrophobiques. Ceci pourrait s'avérer être un avantage puisqu'il rassemble les protéines produisant possiblement un meilleur signal lorsque la protéine d'intérêt se retrouve de manière diffuse dans le tissu. De plus, un papier suggère que l'utilisation d'acétone par la méthode AMeX (Sato et al., 1986) produirait une meilleure préservation histologique et cytologique dans des tranches de tissu congelé que dans les tissus fixés au 4 % PFA et puis

congelés rapidement, sans diminuer le signal produit par les anticorps dans la majorité des cas.

Finalement, l'utilisation de sulfatase n'a pas eu les résultats espérés. Deux situations peuvent expliquer les absences d'augmentation du signal. La première est la difficulté à établir toutes les conditions d'activation requises par la sulfatase, très peu de renseignements quant à ceux-ci étant disponibles. De plus, l'utilisation de la sulfatase pour des fins de détections immunologiques est, à défaut de ne pas avoir trouvé d'articles de littérature sur ce sujet, inappropriée. Il est donc difficile de déterminer si l'enzyme était bel et bien active. En l'absence d'activité de l'enzyme, la sulfation demeure et nous ne parvenons pas à rétablir l'affinité entre l'antigène et son anticorps. En second lieu, il se pourrait que la sulfation, si présente, ne joue aucun rôle important dans l'affinité que l'anticorps possède pour son antigène (Schmidt et al., 2012). D'autres modifications post-translationnelle pourraient affecter le résidu tyrosine tel que la phosphorylation et la glycosylation ou intervenir dans l'organisation structurelle de la protéine auquel l'épitope est attaché ou encore comme mentionné précédemment, modifié l'affinité aux anticorps. La structure pourrait être changée de manière à intégrer l'épitope dans la membrane cellulaire lipidique masquant sa détection (Stone et al., 2009). Cependant, Schmidt et ses collègues (2012) ont rapporté que seule la sulfation avait un impact, même si celui-ci est mineur.

De plus, la théorie concernant l'insertion de l'épitope dans la membrane n'est pas confirmée. En effet, l'extraction des lipides au moyen de la méthode de clarification des tissus CLARITY, n'est pas parvenue à augmenter le signal produit par l'épitope suggérant que celui-ci ne serait pas caché. Cependant, cette remarque doit être considérée avec précaution puisque cette approche, bien que nouvelle dans le laboratoire, n'a été entreprise qu'à quelques reprises et ce de manière exploratoire. Cette approche doit être peaufinée de sorte à produire des coupes suffisamment petites tout en évitant la congélation puisque le tissu clarifié ne tolère pas très bien cette étape. Compte tenu de l'épaisseur des coupes produites, l'utilisation d'anticorps fluorescents est à prioriser et cette approche n'a jamais été entreprise.

Pour conclure, les données recueillies pour l'évaluation de la nociception d'origine thermique chez les souris *AvCre<sup>ERT2</sup>:STOP-FlagDOP*, même si préliminaires, suggèrent que

non seulement le récepteur DOP est capable d'inhiber la nociception d'origine thermique, en plus la prévention de son expression dans les couches autres que I et II dans la moelle épinière ne renverse pas ses effets. La localisation préférentielle du récepteur dans les afférences primaires semble suffire afin de produire une anti-hyperalgésie significative à la suite d'injection intrathécale de l'agoniste DOP, deltorphine II. La capacité du DOP à produire une analgésie suivant une stimulation thermique est cependant très controversée (Normandin et al., 2013 ; Scherrer et al., 2009) et ainsi le résultat obtenu doit être renforcé par l'augmentation de la taille de l'échantillon avant d'être confirmé. La capacité du récepteur à inhiber la douleur d'origine thermique et chimique en situation de douleur tout en évitant de stimuler les régions cérébrales reliées à la récompense pourrait être très intéressante pour éviter la dépendance et la sédation associées à la prise d'opioïdes morphiniques. Malheureusement, pour ce qui est de l'étude immunohistologique, la détection ne s'est pas avérée un succès et donc l'optimisation du protocole utilisé doit encore être poursuivie afin de pouvoir évaluer hors de tout doute la distribution du DOP dans les différents nocicepteurs des fibres afférentes primaires. Par contre, une difficulté quant à la détection du FLAG a été relevée dans la littérature portant sur l'influence d'une protéine phosphatase  $\beta$   $Mg^{2+}$ -dépendante présente le système nerveux central du rongeur (Schafer & Braun, 1995). Ces derniers rapportent que les anticorps anti-FLAG auraient une grande affinité pour cette phosphatase et ainsi nuirait à la détection de l'épitope FLAG par la présence d'un motif de 5 acides aminés sur 8 identiques à ceux de l'épitope FLAG. Ce qui expliquerait la capacité de détection du FLAG dans d'autres tissus que ceux du système nerveux central (Ferrando et al., 2015). Ceci fournirait aussi une explication quant à l'observation d'une bande supplémentaire pour nos deux génotypes (KO et KI) dans notre essai de co-immunoprécipitation et d'immunobuvardage (voir fig. 3D).

## LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abdallah, K., & Gendron, L. (2018). The Delta Opioid Receptor in Pain Control. Dans E. M. Jutkiewicz (Éd.), *Delta Opioid Receptor Pharmacology and Therapeutic Applications* (p. 147-177). Springer International Publishing.  
[https://doi.org/10.1007/164\\_2017\\_32](https://doi.org/10.1007/164_2017_32)
- Abdallah, K., Nadeau, F., Bergeron, F., Blouin, S., Blais, V., Bradbury, K. M., Lavoie, C. L., Parent, J.-L., & Gendron, L. (2018). Adeno-associated virus 2/9 delivery of Cre recombinase in mouse primary afferents. *Scientific Reports*, 8(1), 7321.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-25626-y>
- Abrahamsen, B., Zhao, J., Asante, C. O., Cendan, C. M., Marsh, S., Martinez-Barbera, J. P., Nassar, M. A., Dickenson, A. H., & Wood, J. N. (2008). The Cell and Molecular Basis of Mechanical, Cold, and Inflammatory Pain. *Science*, 321(5889), 702-705.  
<https://doi.org/10.1126/science.1156916>
- Al-Hasani, R., & Bruchas, M. R. (2011). Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-Dependent Signaling and Behavior. *Anesthesiology*, 115(6), 1363-1381.  
<https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e318238bba6>
- Bandolier. (2007). *Oxford League Table of Analgesic Efficacy*.  
<http://www.bandolier.org.uk/booth/painpag/Acutrev/Analgesics/lftab.html>
- Bao, L., Jin, S.-X., Zhang, C., Wang, L.-H., Xu, Z.-Z., Zhang, F.-X., Wang, L.-C., Ning, F.-S., Cai, H.-J., Guan, J.-S., Xiao, H.-S., Xu, Z.-Q. D., He, C., Hökfelt, T., Zhou, Z., & Zhang, X. (2003). Activation of delta opioid receptors induces receptor insertion and neuropeptide secretion. *Neuron*, 37(1), 121-133.
- Barrot, M. (2012). Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*, 211, 39-50. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.041>
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*, 139(2), 267-284.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>
- Basbaum, A. I., & Jessell, T. M. (2000). Perception of Pain. Dans E. R. Kandel, A. I. Basbaum, & T. M. Jessell (Éds.), *Principles of Neural Science* (Fourth, p. 472-491). Appleton and Lange.
- Beaudry, H., Mercier-Blais, A.-A., Delaygue, C., Lavoie, C., Parent, J.-L., Neugebauer, W., & Gendron, L. (2015). Regulation of  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptor functions : Involvement of cyclin-dependent kinase 5. *British Journal of Pharmacology*, 172(10), 2573-2587. <https://doi.org/10.1111/bph.13088>
- Beaudry, H., Proteau-Gagné, A., Li, S., Dory, Y., Chavkin, C., & Gendron, L. (2009). Differential noxious and motor tolerance of chronic delta opioid receptor agonists in rodents. *Neuroscience*, 161(2), 381-391.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.03.053>
- Beaudry, Hélène, Dubois, D., & Gendron, L. (2011). Activation of Spinal  $\mu$ - and  $\delta$ -Opioid Receptors Potently Inhibits Substance P Release Induced by Peripheral Noxious Stimuli. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(37), 13068-13077. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1817-11.2011>

- Bie, B., & Pan, Z. Z. (2007). Trafficking of central opioid receptors and descending pain inhibition. *Molecular Pain*, 3, 37. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-3-37>
- Bonin, R. P., Bories, C., & De Koninck, Y. (2014). A simplified up-down method (SUDO) for measuring mechanical nociception in rodents using von Frey filaments. *Molecular Pain*, 10, 26. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-10-26>
- Brandt, M. R., Furness, M. S., Rice, K. C., Fischer, B. D., & Negus, S. S. (2001). Studies of Tolerance and Dependence with the  $\mu$ -Opioid Agonist SNC80 in Rhesus Monkeys Responding under a Schedule of Food Presentation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299(2), 629-637.
- Cahill, C. M., Morinville, A., Hoffert, C., O'Donnell, D., & Beaudet, A. (2003). Up-regulation and trafficking of delta opioid receptor in a model of chronic inflammation : Implications for pain control. *Pain*, 101(1-2), 199-208.
- Cavanaugh, D. J., Lee, H., Lo, L., Shields, S. D., Zylka, M. J., Basbaum, A. I., & Anderson, D. J. (2009). Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(22), 9075-9080. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901507106>
- Chen, Y. L., Law, P.-Y., & Loh, H. H. (2006). Sustained Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Nuclear Factor  $\kappa$ B Signaling Mediates G Protein-coupled  $\delta$ -Opioid Receptor Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*, 281(6), 3067-3074. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506721200>
- Cheng, P. Y., Wu, D., Soong, Y., McCabe, S., Decena, J. A., & Szeto, H. H. (1993). Role of mu 1- and delta-opioid receptors in modulation of fetal EEG and respiratory activity. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 265(2), R433-R438. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1993.265.2.R433>
- Cheng, Z.-J., Yu, Q.-M., Wu, Y.-L., Ma, L., & Pei, G. (1998). Selective Interference of  $\beta$ -Arrestin 1 with  $\kappa$  and  $\delta$  but Not  $\mu$  Opioid Receptor/G Protein Coupling. *Journal of Biological Chemistry*, 273(38), 24328-24333. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.38.24328>
- Chung, P. C. S., Boehrer, A., Stephan, A., Matifas, A., Scherrer, G., Darq, E., Befort, K., & Kieffer, B. L. (2015). Delta opioid receptors expressed in forebrain GABAergic neurons are responsible for SNC80-induced seizures. *Behavioural brain research*, 278, 429-434. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.029>
- Codd, E. E., Carson, J. R., Colburn, R. W., Stone, D. J., Besien, C. R. V., Zhang, S.-P., Wade, P. R., Gallantine, E. L., Meert, T. F., Molino, L., Pullan, S., Razler, C. M., Dax, S. L., & Flores, C. M. (2009). JNJ-20788560 [9-(8-Azabicyclo[3.2.1]oct-3-ylidene)-9H-xanthene-3-carboxylic Acid Diethylamide], a Selective Delta Opioid Receptor Agonist, Is a Potent and Efficacious Antihyperalgesic Agent That Does Not Produce Respiratory Depression, Pharmacologic Tolerance, or Physical Dependence. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 329(1), 241-251. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.146969>
- Commons, K. G., Beck, S. G., Rudoy, C., & Van Bockstaele, E. J. (2001). Anatomical evidence for presynaptic modulation by the delta opioid receptor in the ventrolateral periaqueductal gray of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 430(2), 200-208.



- Commons, Kathryn G. (2003). Translocation of presynaptic delta opioid receptors in the ventrolateral periaqueductal gray after swim stress. *The Journal of Comparative Neurology*, 464(2), 197-207. <https://doi.org/10.1002/cne.10788>
- Cowan, N. (1988). Evolving conceptions of memory storage, selective attention, and their mutual constraints within the human information-processing system. *Psychological Bulletin*, 104(2), 163-191. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.104.2.163>
- Cox, B. M. (2012). Recent Developments in the Study of Opioid Receptors. *Molecular Pharmacology*, 83(4), 723-728. <https://doi.org/10.1124/mol.112.083279>
- Damien, J., Colloca, L., Bellei-Rodriguez, C.-É., & Marchand, S. (2018). Pain Modulation : From Conditioned Pain Modulation to Placebo and Nocebo Effects in Experimental and Clinical Pain. *International review of neurobiology*, 139, 255-296. <https://doi.org/10.1016/bs.irm.2018.07.024>
- De Gregori, S., De Gregori, M., Ranzani, G. N., Allegri, M., Minella, C., & Regazzi, M. (2012). Morphine metabolism, transport and brain disposition. *Metabolic Brain Disease*, 27(1), 1-5. <https://doi.org/10.1007/s11011-011-9274-6>
- de Sousa, M. V. P., Ferraresi, C., de Magalhães, A. C., Yoshimura, E. M., & Hamblin, M. R. (2014). Building, testing and validating a set of home-made von Frey filaments : A precise, accurate and cost effective alternative for nociception assessment. *Journal of neuroscience methods*, 232, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.04.017>
- Décaillot, F. M., Rozenfeld, R., Gupta, A., & Devi, L. A. (2008). Cell surface targeting of  $\mu$ - $\delta$  opioid receptor heterodimers by RTP4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(41), 16045-16050. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804106105>
- Dejean, C., Boraud, T., & Le Moine, C. (2013). Opiate dependence induces network state shifts in the limbic system. *Neurobiology of Disease*, 59, 220-229. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.07.012>
- Deupi, X., & Kobilka, B. K. (2010). Energy landscapes as a tool to integrate GPCR structure, dynamics and function. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 25(5), 293-303. <https://doi.org/10.1152/physiol.00002.2010>
- Dixon, W. J. (1980). Efficient Analysis of Experimental Observations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 20(1), 441-462. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.20.040180.002301>
- Dondio, G., Ronzoni, S., Eggleston, D. S., Artico, M., Petrillo, P., Petrone, G., Visentin, L., Farina, C., Vecchiotti, V., & Clarke, G. D. (1997). Discovery of a Novel Class of Substituted Pyrrolooctahydroisoquinolines as Potent and Selective  $\delta$  Opioid Agonists, Based on an Extension of the Message-Address Concept. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40(20), 3192-3198. <https://doi.org/10.1021/jm9608218>
- Dondio, G., Ronzoni, S., Farina, C., Graziani, D., Parini, C., Petrillo, P., & Giardina, G. A. M. (2001). Selective  $\delta$  opioid receptor agonists for inflammatory and neuropathic pain. *Il Farmaco*, 56(1), 117-119. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(01\)01020-5](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01020-5)
- Du, H., Hou, P., Zhang, W., & Li, Q. (2018). Advances in CLARITY-based tissue clearing and imaging. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16(3), 1567-1576. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6374>

- Dubois, D., & Gendron, L. (2010). Delta opioid receptor-mediated analgesia is not altered in preprotachykinin A knockout mice. *The European Journal of Neuroscience*, 32(11), 1921-1929. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07466.x>
- Einhauer, A., & Jungbauer, A. (2001). *The FLAGe peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins*. 11.
- Feng, P., Rahim, R. T., Cowan, A., Liu-Chen, L.-Y., Peng, X., Gaughan, J., Meissler, J. J., Adler, M. W., & Eisenstein, T. K. (2006). Effects of mu, kappa or delta opioids administered by pellet or pump on oral Salmonella infection and gastrointestinal transit. *European Journal of Pharmacology*, 534(1), 250-257. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.01.048>
- Feng, Y., He, X., Yang, Y., Chao, D., Lazarus, L. H., & Xia, Y. (2012). Current Research on Opioid Receptor Function. *Current Drug Targets*, 13(2), 230-246.
- Ferrando, R. E., Newton, K., Chu, F., Webster, J. D., & French, D. M. (2015). Immunohistochemical Detection of FLAG-Tagged Endogenous Proteins in Knock-In Mice. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 63(4), 244-255. <https://doi.org/10.1369/0022155414568101>
- Filliol, D., Ghozland, S., Chluba, J., Martin, M., Matthes, H. W., Simonin, F., Befort, K., Gavériaux-Ruff, C., Dierich, A., LeMeur, M., Valverde, O., Maldonado, R., & Kieffer, B. L. (2000). Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nature Genetics*, 25(2), 195-200. <https://doi.org/10.1038/76061>
- Finn, A. K., & Whistler, J. L. (2001). Endocytosis of the Mu Opioid Receptor Reduces Tolerance and a Cellular Hallmark of Opiate Withdrawal. *Neuron*, 32(5), 829-839. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00517-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00517-7)
- Fraker, P. J., & Speck, J. C. (1978). Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphrenylglycoluril. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 80(4), 849-857.
- Fraser, G. L., Gaudreau, G.-A., Clarke, P. B. S., Ménard, D. P., & Perkins, M. N. (2000). Antihyperalgesic effects of  $\delta$  opioid agonists in a rat model of chronic inflammation. *British Journal of Pharmacology*, 129(8), 1668-1672. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703248>
- Fruhstorfer, H., Gross, W., & Selbmann, O. (2001). von Frey hairs : New materials for a new design. *European Journal of Pain*, 5(3), 341-342. <https://doi.org/10.1053/eujp.2001.0250>
- Gallantine, E. L., & Meert, T. F. (2005). A Comparison of the Antinociceptive and Adverse Effects of the  $\mu$ -Opioid Agonist Morphine and the  $\delta$ -Opioid Agonist SNC80. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 97(1), 39-51. [https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto\\_97107.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto_97107.x)
- Gavériaux-Ruff, C., Karchewski, L. A., Hever, X., Matifas, A., & Kieffer, B. L. (2008). Inflammatory pain is enhanced in delta opioid receptor-knockout mice. *The European journal of neuroscience*, 27(10), 2558-2567. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06223.x>
- Gaveriaux-Ruff, C., Nozaki, C., Nadal, X., Hever, X. C., Weibel, R., Matifas, A., Reiss, D., Filliol, D., Nassar, M. A., Wood, J. N., Maldonado, R., & Kieffer, B. L. (2011). Genetic ablation of delta opioid receptors in nociceptive sensory neurons increases

- chronic pain and abolishes opioid analgesia. *Pain*, 152(6), 1238-1248.  
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.12.031>
- Gendron, L., Esdaile, M., Mennicken, F., Pan, H., O'Donnell, D., Vincent, J.-P., Devi, L. A., Cahill, C. M., Stroh, T., & Beaudet, A. (2007). Morphine priming in rats with chronic inflammation reveals a dichotomy between antihyperalgesic and antinociceptive properties of deltorphin. *Neuroscience*, 144(1), 263-274.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.08.077>
- Gendron, L., Pintar, J. E., & Chavkin, C. (2007). Essential role of mu opioid receptor in the regulation of delta opioid receptor-mediated antihyperalgesia. *Neuroscience*, 150(4), 807-817. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.09.060>
- Gendron, Louis, Lucido, A. L., Mennicken, F., O'Donnell, D., Vincent, J.-P., Stroh, T., & Beaudet, A. (2006). Morphine and Pain-Related Stimuli Enhance Cell Surface Availability of Somatic  $\delta$ -Opioid Receptors in Rat Dorsal Root Ganglia. *Journal of Neuroscience*, 26(3), 953-962. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3598-05.2006>
- George, S. R., Fan, T., Xie, Z., Tse, R., Tam, V., Varghese, G., & O'Dowd, B. F. (2000). Oligomerization of  $\mu$  and  $\delta$  Opioid Receptors : Generation of Novel Functional Properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(34), 26128-26135.
- Goldenberg, D. L. (2010). The Interface of Pain and Mood Disturbances in the Rheumatic Diseases. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 40(1), 15-31.  
<https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2008.11.005>
- Gomes, I., Jordan, B. A., Gupta, A., Trapaidze, N., Nagy, V., & Devi, L. A. (2000). Heterodimerization of  $\mu$  and  $\delta$  Opioid Receptors : A Role in Opiate Synergy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(22), RC110.
- Gomes, Ivone, Gupta, A., Filipovska, J., Szeto, H. H., Pintar, J. E., & Devi, L. A. (2004). A role for heterodimerization of  $\mu$  and  $\delta$  opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(14), 5135-5139. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307601101>
- Gutstein, H. B., Rubie, E. A., Mansour, A., Akil, H., & Woodgett, J. R. (1997). Opioid Effects on Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Cascades. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 87(5), 1118-1126.
- Hopp, T. P., Prickett, K. S., Price, V. L., Libby, R. T., March, C. J., Pat Cerretti, D., Urdal, D. L., & Conlon, P. J. (1988). A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification. *Bio/Technology*, 6(10), 1204-1210. <https://doi.org/10.1038/nbt1088-1204>
- Hudzik, T. J., Pietras, M. R., Caccese, R., Bui, K. H., Yocca, F., Paronis, C. A., & M.D.B., S. (2014). Effects of the  $\delta$  opioid agonist AZD2327 upon operant behaviors and assessment of its potential for abuse. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 124, 48-57. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.05.009>
- Hunter, M. R., Grimsey, N. L., & Glass, M. (2016). Sulfation of the FLAG epitope is affected by co-expression of G protein-coupled receptors in a mammalian cell model. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep27316>
- Hurley, R. W., & Hammond, D. L. (2000). The Analgesic Effects of Supraspinal  $\mu$  and  $\delta$  Opioid Receptor Agonists Are Potentiated during Persistent Inflammation. *Journal of Neuroscience*, 20(3), 1249-1259. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-03-01249.2000>

- Ikeda, K., Koga, T., Sasaki, F., Ueno, A., Saeki, K., Okuno, T., & Yokomizo, T. (2017). Generation and characterization of a human-mouse chimeric high-affinity antibody that detects the DYKDDDDK FLAG peptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 486(4), 1077-1082. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.165>
- Jensen, K. H. R., & Berg, R. W. (2017). Advances and perspectives in tissue clearing using CLARITY. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 86, 19-34. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2017.07.005>
- Kalso, E., Edwards, J. E., Moore, R. A., & McQuay, H. J. (2004). Opioids in chronic non-cancer pain : Systematic review of efficacy and safety. *Pain*, 112(3), 372-380. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2004.09.019>
- Kenakin, T. (2011). Functional Selectivity and Biased Receptor Signaling. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 336(2), 296-302. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.173948>
- Kenakin, Terry. (2003). Ligand-selective receptor conformations revisited : The promise and the problem. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(7), 346-354. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(03\)00167-6](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(03)00167-6)
- Khademi, H., Kamangar, F., Brennan, P., & Malekzadeh, R. (2016). Opioid Therapy and its Side Effects : A Review. *Archives of Iranian Medecine*, 19(12), 870-876. <https://doi.org/10.1016/j.aim.2016.09.010>
- Kim, J., Ham, S., Hong, H., Moon, C., & Im, H.-I. (2016). Brain Reward Circuits in Morphine Addiction. *Molecules and Cells*, 39(9), 645-653. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.0137>
- Knappik, A., & Plückthun, A. (1994). An improved affinity tag based on the FLAG peptide for the detection and purification of recombinant antibody fragments. *BioTechniques*, 17(4), 754-761.
- Kondo, I., Marvizon, J. C. G., Song, B., Salgado, F., Codeluppi, S., Hua, X.-Y., & Yaksh, T. L. (2005). Inhibition by spinal mu- and delta-opioid agonists of afferent-evoked substance P release. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(14), 3651-3660. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0252-05.2005>
- Koucheck, M., Takasusuki, T., Terashima, T., Yaksh, T. L., & Xu, Q. (2013). Effects of Intrathecal SNC80, a Delta Receptor Ligand, on Nociceptive Threshold and Dorsal Horn Substance P Release. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 347(2), 258-264. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.206573>
- Lau, J., Minett, M. S., Zhao, J., Dennehy, U., Wang, F., Wood, J. N., & Bogdanov, Y. D. (2011a). Temporal Control of Gene Deletion in Sensory Ganglia Using a Tamoxifen-Inducible Advillin-CreERT2Recombinase Mouse. *Molecular Pain*, 7, 1744-8069-7-100. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-100>
- Law, P. Y., & Loh, H. H. (1993). Delta-Opioid receptor activates cAMP phosphodiesterase activities in neuroblastoma x glioma NG108-15 hybrid cells. *Molecular Pharmacology*, 43(5), 684-693.
- Law, P.-Y., Erickson-Herbrandson, L. J., Zha, Q. Q., Solberg, J., Chu, J., Sarre, A., & Loh, H. H. (2005). Heterodimerization of  $\mu$ - and  $\delta$ -Opioid Receptors Occurs at the Cell Surface Only and Requires Receptor-G Protein Interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 280(12), 11152-11164. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500171200>

- Li, Y., Xu, J., Wan, P., Yu, T., & Zhu, D. (2018). Optimization of GFP Fluorescence Preservation by a Modified uDISCO Clearing Protocol. *Frontiers in Neuroanatomy*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00067>
- Liu, X., Kai, M., Jin, L., & Wang, R. (2009). Computational study of the heterodimerization between mu and delta receptors. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 23(6), 321-332. <https://doi.org/10.1007/s10822-009-9262-7>
- Lobbestael, E., Reumers, V., Ibrahimi, A., Paesen, K., Thiry, I., Gijsbers, R., Van den Haute, C., Debyser, Z., Baekelandt, V., & Taymans, J.-M. (2010). Immunohistochemical detection of transgene expression in the brain using small epitope tags. *BMC Biotechnology*, 10, 16. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-16>
- Lynch, M. E. (2011). The need for a Canadian pain strategy. *Pain Research & Management : The Journal of the Canadian Pain Society*, 16(2), 77-80.
- Mansour, A., Khachaturian, H., Lewis, M. E., Akil, H., & Watson, S. J. (1988). Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends in Neurosciences*, 11(7), 308-314. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(88\)90093-8](https://doi.org/10.1016/0166-2236(88)90093-8)
- Martinov, T., Mack, M., Sykes, A., & Chatterjea, D. (2013). Measuring Changes in Tactile Sensitivity in the Hind Paw of Mice Using an Electronic von Frey Apparatus. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 82. <https://doi.org/10.3791/51212>
- May, C. N., Dashwood, M. R., Whitehead, C. J., & Mathias, C. J. (1989). Differential cardiovascular and respiratory responses to central administration of selective opioid agonists in conscious rabbits : Correlation with receptor distribution. *British Journal of Pharmacology*, 98(3), 903-913.
- McDonald, J., & Lambert, D. G. (2015). Opioid receptors. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*, 15(5), 219-224. <https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mku041>
- Melzack, R., & Wall, P. D. (1965). Pain Mechanisms : A New Theory. *Science*, 150(3699), 971-979. <https://doi.org/10.1126/science.150.3699.971>
- Mennicken, F., Zhang, J., Hoffert, C., Ahmad, S., Beaudet, A., & O'Donnell, D. (2003). Phylogenetic changes in the expression of delta opioid receptors in spinal cord and dorsal root ganglia. *Journal of Comparative Neurology*, 465(3), 349-360. <https://doi.org/10.1002/cne.10839>
- Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*, 66(6), 355-474. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00009-6](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00009-6)
- Nadal, X., Baños, J.-E., Kieffer, B. L., & Maldonado, R. (2006). Neuropathic pain is enhanced in  $\delta$ -opioid receptor knockout mice. *European Journal of Neuroscience*, 23(3), 830-834. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04569.x>
- Nagi, K., Charfi, I., & Pineyro, G. (2015). Kir3 channels undergo arrestin-dependant internalization following delta opioid receptor activation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(18), 3543-3557. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1899-x>
- Normandin, A., Luccarini, P., Molat, J.-L., Gendron, L., & Dallel, R. (2013). Spinal mu and delta opioids inhibit both thermal and mechanical pain in rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(28), 11703-11714. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1631-13.2013>
- North, R. A., Williams, J. T., Surprenant, A., & Christie, M. J. (1987). Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(15), 5487-5491.
- Oertel, B., & Lötsch, J. (2008). Genetic mutations that prevent pain : Implications for future pain medication. *Pharmacogenomics*, 9(2), 179-194.  
<https://doi.org/10.2217/14622416.9.2.179>
- Olausson, H., Cole, J., Rylander, K., McGlone, F., Lamarre, Y., Wallin, B. G., Krämer, H., Wessberg, J., Elam, M., Bushnell, M. C., & Vallbo, Å. (2008). Functional role of unmyelinated tactile afferents in human hairy skin : Sympathetic response and perceptual localization. *Experimental Brain Research*, 184(1), 135-140.  
<https://doi.org/10.1007/s00221-007-1175-x>
- Parent, A. J., Beaudet, N., Beaudry, H., Bergeron, J., Bérubé, P., Drolet, G., Sarret, P., & Gendron, L. (2012). Increased anxiety-like behaviors in rats experiencing chronic inflammatory pain. *Behavioural Brain Research*, 229(1), 160-167.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.01.001>
- Peng, J., Sarkar, S., & Chang, S. L. (2012). Opioid receptor expression in human brain and peripheral tissues using absolute quantitative real-time RT-PCR. *Drug and Alcohol Dependence*, 124(3), 223-228. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2012.01.013>
- Perl, E. R. (2007). Ideas about pain, a historical view. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(1), 71-80. <https://doi.org/10.1038/nrn2042>
- Petrillo, P., Angelici, O., Bingham, S., Ficalora, G., Garnier, M., Zaratini, P. F., Petrone, G., Pozzi, O., Sbacchi, M., Stean, T. O., Upton, N., Dondio, G. M., & Scheideler, M. A. (2003). Evidence for a Selective Role of the  $\delta$ -Opioid Agonist [8R-(4bS\*,8a $\alpha$ ,8a $\beta$ ,12b $\beta$ )]7,10-Dimethyl-1-methoxy-11-(2-methylpropyl)oxycarbonyl 5,6,7,8,12,12b-hexahydro-(9H)-4,8-methanobenzofuro[3,2-e]pyrrolo[2,3-g]isoquinoline Hydrochloride (SB-235863) in Blocking Hyperalgesia Associated with Inflammatory and Neuropathic Pain Responses. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307(3), 1079-1089.  
<https://doi.org/10.1124/jpet.103.055590>
- Pitcher, G. M., Ritchie, J., & Henry, J. L. (1999). Paw withdrawal threshold in the von Frey hair test is influenced by the surface on which the rat stands. *Journal of Neuroscience Methods*, 87(2), 185-193. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(99\)00004-7](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(99)00004-7)
- Porreca, F., Mosberg, H. I., Hurst, R., Hruby, V. J., & Burks, T. F. (1984). Roles of mu, delta and kappa opioid receptors in spinal and supraspinal mediation of gastrointestinal transit effects and hot-plate analgesia in the mouse. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 230(2), 341-348.
- PPSG Opioid Consumption Map. (s. d.). Consulté 2 janvier 2019, à l'adresse <https://ppsg.medicine.wisc.edu/>
- Pradhan, A., Becker, J. A. J., Scherrer, G., Tryoen-Toth, P., Filliol, D., Matifas, A., Massotte, D., Gavériaux-Ruff, C., & Kieffer, B. L. (2009). In Vivo Delta Opioid Receptor Internalization Controls Behavioral Effects of Agonists. *PLoS ONE*, 4(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005425>
- Pradhan, A., Befort, K., Nozaki, C., Gavériaux-Ruff, C., & Kieffer, B. L. (2011). The delta opioid receptor : An evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends in pharmacological sciences*, 32(10), 581-590.  
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.06.008>

- Pradhan, A., Smith, M. L., Kieffer, B. L., & Evans, C. J. (2012). Ligand-directed signalling within the opioid receptor family. *British Journal of Pharmacology*, 167(5), 960-969. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02075.x>
- Pradhan, A., Smith, M. L., Zyuzin, J., & Charles, A. (2014).  $\delta$ -Opioid receptor agonists inhibit migraine-related hyperalgesia, aversive state and cortical spreading depression in mice. *British Journal of Pharmacology*, 171(9), 2375-2384. <https://doi.org/10.1111/bph.12591>
- Pradhan, A., Walwyn, W., Nozaki, C., Filliol, D., Erbs, E., Matifas, A., Evans, C., & Kieffer, B. L. (2010). Ligand-Directed Trafficking of the  $\delta$ -Opioid Receptor In Vivo : Two Paths Toward Analgesic Tolerance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(49), 16459-16468. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3748-10.2010>
- Rachinger-adam, B., Conzen, P., & Azad, S. C. (2011). Pharmacology of peripheral opioid receptors. *Current Opinion in Anaesthesiology*, 24(4), 408-413. <https://doi.org/10.1097/ACO.0b013e32834873e5>
- Raehal, K. M., Schmid, C. L., Groer, C. E., & Bohn, L. M. (2011). Functional Selectivity at the  $\mu$ -Opioid Receptor : Implications for Understanding Opioid Analgesia and Tolerance. *Pharmacological Reviews*, 63(4), 1001-1019. <https://doi.org/10.1124/pr.111.004598>
- Rau, K. K., Caudle, R. M., Cooper, B. Y., & Johnson, R. D. (2005). Diverse immunocytochemical expression of opioid receptors in electrophysiologically defined cells of rat dorsal root ganglia. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 29(4), 255-264. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2005.02.002>
- Reiss, D., Ceredig, R. A., Secher, T., Boué, J., Barreau, F., Dietrich, G., & Gavériaux-Ruff, C. (2017). Mu and delta opioid receptor knockout mice show increased colonic sensitivity. *European Journal of Pain (London, England)*, 21(4), 623-634. <https://doi.org/10.1002/ejp.965>
- Rutherford, J. M., Wang, J., Xu, H., Dersch, C. M., Partilla, J. S., Rice, K. C., & Rothman, R. B. (2008). Evidence for a  $\mu$ - $\delta$  opioid receptor complex in CHO cells co-expressing  $\mu$  and  $\delta$  opioid peptide receptors. *Peptides*, 29(8), 1424-1431. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.03.019>
- Sato, Y., Mukai, K., Watanabe, S., Goto, M., & Shimosato, Y. (1986). The AMeX method. A simplified technique of tissue processing and paraffin embedding with improved preservation of antigens for immunostaining. *The American Journal of Pathology*, 125(3), 431-435.
- Sauriyal, D. S., Jaggi, A. S., & Singh, N. (2011). Extending pharmacological spectrum of opioids beyond analgesia : Multifunctional aspects in different pathophysiological states. *Neuropeptides*, 45(3), 175-188. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2010.12.004>
- Schafer, K., & Braun, T. (1995). Monoclonal Anti-FLAG Antibodies React with a New Isoform of Rat Mg<sup>2+</sup> Dependent Protein Phosphatase  $\beta$ . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 207(2), 708-714. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1245>
- Scherrer, Gregory, Imamachi, N., Cao, Y.-Q., Contet, C., Mennicken, F., O'Donnell, D., Kieffer, B. L., & Basbaum, A. I. (2009). Dissociation of the Opioid Receptor Mechanisms that Control Mechanical and Heat Pain. *Cell*, 137(6), 1148-1159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.019>

- Scherrer, Grégory, Tryoen-Tóth, P., Filliol, D., Matifas, A., Laustriat, D., Cao, Y. Q., Basbaum, A. I., Dierich, A., Vonesh, J.-L., Gavériaux-Ruff, C., & Kieffer, B. L. (2006). Knockin mice expressing fluorescent  $\delta$ -opioid receptors uncover G protein-coupled receptor dynamics in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(25), 9691-9696. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603359103>
- Schmidt, P. M., Sparrow, L. G., Attwood, R. M., Xiao, X., Adams, T. E., & McKimm-Breschkin, J. L. (2012). Taking down the FLAG! How insect cell expression challenges an established tag-system. *PloS One*, 7(6), e37779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037779>
- Shevtsova, Z., Malik, J. M. I., Michel, U., Schöll, U., Bähr, M., & Kügler, S. (2006). Evaluation of epitope tags for protein detection after in vivo CNS gene transfer. *European Journal of Neuroscience*, 23(8), 1961-1969. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04725.x>
- Shrout, P. E., & Fleiss, J. L. (1979). Intraclass Correlations : Uses in Assessing Rater Reliability. *Psychological Bulletin*, 86(2), 420-428.
- Slootstra, J. W. (1997). Identification of new tag sequences with differential and selective recognition properties for the anti-FLAG monoclonal antibodies M1, M2 and M5. *Molecular Diversity*, 2(3), 156-164. Scopus. <https://doi.org/10.1007/BF01682203>
- Snead, O. C. (1986). Opiate-induced seizures : A study of  $\mu$  and  $\delta$  specific mechanisms. *Experimental Neurology*, 93(2), 348-358. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(86\)90195-0](https://doi.org/10.1016/0014-4886(86)90195-0)
- Spahn, V., & Stein, C. (2017). Targeting delta opioid receptors for pain treatment : Drugs in phase I and II clinical development. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 26(2), 155-160. <https://doi.org/10.1080/13543784.2017.1275562>
- Stone, M. J., Chuang, S., Hou, X., Shoham, M., & Zhu, J. Z. (2009). Tyrosine sulfation : An increasingly recognised post-translational modification of secreted proteins. *New Biotechnology*, 25(5), 299-317. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.03.011>
- Szeto, H. H., Soong, Y., Wu, D., Olariu, N., Kett, A., Kim, H., & Clapp, J. F. (1999). Respiratory depression after intravenous administration of  $\delta$ -selective opioid peptide analogs. *Peptides*, 20(1), 101-105. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(98\)00141-7](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(98)00141-7)
- Tomkowicz, B., Singh, S. P., Cartas, M., & Srinivasan, A. (2002). Human herpesvirus-8 encoded Kaposin : Subcellular localization using immunofluorescence and biochemical approaches. *DNA And Cell Biology*, 21(3), 151-162.
- Traynor, J. T. L. and J. R. (2013, novembre 30). *Opioid Receptor Interacting Proteins and the Control of Opioid Signaling*. Current Pharmaceutical Design. <http://www.eurekaselect.com/119416/article>
- Tsao, P. I., & Zastrow, M. von. (2000). Type-specific Sorting of G Protein-coupled Receptors after Endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 11130-11140. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.11130>
- Tudashki, H. B., Robertson, D. N., Schiller, P. W., & Pineyro, G. (2014). Endocytic Profiles of  $\delta$ -Opioid Receptor Ligands Determine the Duration of Rapid but Not Sustained cAMP Responses. *Molecular Pharmacology*, 85(1), 148-161. <https://doi.org/10.1124/mol.113.089003>



- van Bockstaele, E. J., Commons, K., & Pickel, V. M. (1997). Delta-opioid receptor is present in presynaptic axon terminals in the rat nucleus locus coeruleus : Relationships with methionine5-enkephalin. *The Journal of Comparative Neurology*, 388(4), 575-586.
- van Rijn, R. M., Brissett, D. I., & Whistler, J. L. (2012). Emergence of functional spinal delta opioid receptors after chronic ethanol exposure. *Biological Psychiatry*, 71(3), 232-238. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.07.015>
- Vardanyan, R. S., Cain, J. P., Haghighi, S. M., Kumirov, V. K., McIntosh, M. I., Sandweiss, A. J., Porreca, F., & Hruby, V. J. (2017). Synthesis and Investigation of Mixed  $\mu$ -Opioid and  $\delta$ -Opioid Agonists as Possible Bivalent Ligands for Treatment of Pain. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 54(2), 1228-1235. <https://doi.org/10.1002/jhet.2696>
- Wan, P., Zhu, J., Xu, J., Li, Y., Yu, T., & Zhu, D. (2018). Evaluation of seven optical clearing methods in mouse brain. *Neurophotonics*, 5(3), 035007. <https://doi.org/10.1117/1.NPh.5.3.035007>
- Wang, F., Bélanger, E., Côté, S. L., Desrosiers, P., Prescott, S. A., Côté, D. C., & De Koninck, Y. (2018). Sensory Afferents Use Different Coding Strategies for Heat and Cold. *Cell Reports*, 23(7), 2001-2013. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.065>
- Wang, H., & Wessendorf, M. W. (2001). Equal proportions of small and large DRG neurons express opioid receptor mRNAs. *The Journal of Comparative Neurology*, 429(4), 590-600. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20010122\)429:4<590::aid-cne6>3.0.co;2-v](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20010122)429:4<590::aid-cne6>3.0.co;2-v)
- Wen, Y.-R., Wang, C.-C., Yeh, G.-C., Hsu, S.-F., Huang, Y.-J., Li, Y.-L., & Sun, W.-Z. (2010). DNIC-mediated analgesia produced by a supramaximal electrical or a high-dose formalin conditioning stimulus : Roles of opioid and  $\alpha$ 2-adrenergic receptors. *Journal of Biomedical Science*, 17(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-19>
- Whistler, J. L., Enquist, J., Marley, A., Fong, J., Gladher, F., Tsuruda, P., Murray, S. R., & Zastrow, M. von. (2002). Modulation of Postendocytic Sorting of G Protein-Coupled Receptors. *Science*, 297(5581), 615-620. <https://doi.org/10.1126/science.1073308>
- Woolf, C. J., & Salter, M. W. (2000). Neuronal Plasticity : Increasing the Gain in Pain. *Science*, 288(5472), 1765-1768. <https://doi.org/10.1126/science.288.5472.1765>
- Xie, W.-Y., He, Y., Yang, Y.-R., Li, Y.-F., Kang, K., Xing, B.-M., & Wang, Y. (2009). Disruption of Cdk5-Associated Phosphorylation of Residue Threonine-161 of the  $\delta$ -Opioid Receptor : Impaired Receptor Function and Attenuated Morphine Antinociceptive Tolerance. *Journal of Neuroscience*, 29(11), 3551-3564. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0415-09.2009>
- Yang, B., Yang, F., Zhang, Y., Liu, H., Jin, Y., Cao, W., Zhu, Z., Zheng, H., & Yin, H. (2016). The rescue and evaluation of FLAG and HIS epitope-tagged Asia 1 type foot-and-mouth disease viruses. *Virus Research*, 213, 246-254. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.12.013>
- Yang, P.-P., Yeh, G.-C., Yeh, T.-K., Xi, J., Loh, H. H., Law, P.-Y., & Tao, P.-L. (2016). Activation of delta-opioid receptor contributes to the antinociceptive effect of oxycodone in mice. *Pharmacological Research*, 111, 867-876. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.05.034>

- Zhang, X., Bao, L., Arvidsson, U., Elde, R., & Hökfelt, T. (1998). Localization and regulation of the delta-opioid receptor in dorsal root ganglia and spinal cord of the rat and monkey : Evidence for association with the membrane of large dense-core vesicles. *Neuroscience*, 82(4), 1225-1242.
- Zhang, X, Bao, L., & Li, S. (2015). Opioid receptor trafficking and interaction in nociceptors. *British Journal of Pharmacology*, 172(2), 364-374.  
<https://doi.org/10.1111/bph.12653>
- Zhang, Xu, Bao, L., & Guan, J.-S. (2006). Role of delivery and trafficking of  $\delta$ -opioid peptide receptors in opioid analgesia and tolerance. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(6), 324-329. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.04.005>